

# ポリアミン

## Polyamine

Vol.3 No.1  
Apr. 2016

巻頭言

五十嵐 一衛

シリーズ ポリアミン研究

西村 和洋

人見 清隆

シリーズ 実験手技ノート

植村 武史

大城戸 真喜子

学会報告

村井 法之

年会総括

鈴木 秀之

### 日本ポリアミン学会

The Japanese Society of Polyamine Research

# ポリアミン Polyamine

Vol. 3 No. 1  
Apr. 2016

---

## 巻頭言

ポリアミン研究の発展を目指して 五十嵐 一衛 1

## シリーズ ポリアミン研究

eIF5Aとハイプシンの今昔物語 西村 和洋 2

トランスグルタミナーゼとポリアミン 人見 清隆 8

## シリーズ 実験手技ノート

オルニチン脱炭酸酵素活性の測定 植村 武史、大城戸 真喜子 14

質問コーナー 22

## 学会報告

BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)

ワークショップ開催報告 村井 法之 26

## 第7回年会報告

第7回年会総括 鈴木 秀之 28

日本ポリアミン学会第7回評議員会議事録 29

日本ポリアミン学会第7回総会議事録 31

事務連絡 33

編集後記 36





# ポリアミン研究の発展を目指して

五十嵐 一衛

日本ポリアミン学会 会長

2014年に発足しました日本ポリアミン学会の二代目会長に任命されました五十嵐です。

まず第一に私がやらなければならない事は、“ポリアミン”の研究が面白い事を皆さんに広く知って頂き、世界的にもポリアミン研究が減少しているのに歯止めをかける事です。日本では“日本ポリアミン学会”の前身である第1回日本ポリアミン研究会が、1985年に開催され、演題は35題でした。しかし、昨年11月に開催された日本ポリアミン学会第7回年会の演題は22題でした。この傾向は世界的に見ても同様です。ポリアミン学会で最も研究の進展に貢献している学会であるポリアミンゴードン研究会は1975年から1年おきに、アメリカ合衆国の北部で初夏に開催されます。初めの頃は参加希望者が多く、希望者でも参加できない人が出ました。しかし、2015年の前回の会議は、参加者が100名にならず、いろいろな処に宣伝し、ようやく110人に達し、継続して2017年度の開催が許可になりました。

それでは、ポリアミン研究人口を増やすにはどうしたら良いのでしょうか？一番大切なことは研究室を主宰している先生方が、ポリアミンが面白い研究対象である事を、情熱を持って若い人に伝える事だと思います。低分子生理活性物質で、細胞内にmMオーダーで存在する物質はATP、ポリアミン、グルタチオン位だと思います。いずれも細胞増殖、生存に強く関わっている生理活性物質です。現在はナノモル又はピコモルレベルの研究が流行していますが、細胞内に多く存在する物質も、それなりの存在理由があり、その点を若い研究者に伝える必要があるように思います。現実にはポリアミンは細胞増殖必須因子で、かつ、その作用機作は多彩で、私自身は非常に面白い生理活性物質であると思っています。

前述のように、1985年に日本ポリアミン研究会が発足した当時は、ポリアミン代謝拮抗剤が抗がん剤になる可能性があると考えられ、ポリアミン研究が活性化していたと思います。しかし、現在はポリアミン代謝拮抗剤の抗がん剤としての可能性はかなり低下しています。従いまして、医療との関連を追究する研究を充実させる事が、ポリアミン研究の活性化に繋がると考えています。現在は、原虫トリパノソーマが媒介するアフリカ睡眠病に、オルニチン脱炭酸酵素の阻害剤であるDFMO ( $\alpha$ -difluoromethylornithine)が有効であり、治療薬として使用されていると報告されています。また、私共は高齢者の細胞障害病である脳梗塞や認知症で、ポリアミン、特にスペルミンから産生される“アクロレイン ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CHO}$ )”が細胞障害の主たる原因物質である事を見出しました。また、このアクロレインの主たる解毒物質がグルタチオンである事も見出し、mMオーダーで存在する低分子生理活性物質間の関連に深い因縁を感じています。このように、基礎研究だけでなく、医療の研究も増えてきますと、ポリアミン研究は活発化されると思っています。

また、学会として、若手研究者の活性化を目指し、奨励賞の創設を提案していきたいと思っています。

結論ですが、ポリアミンが非常に面白い低分子生理活性物質である事を、多くの研究者の皆さんに知って頂き、少しでも多くの方が、ポリアミン研究に関わって下さる事を祈りつつ、会長就任の挨拶とさせていただきます。

# eIF5Aとハイプシンの今昔物語

西村 和洋

千葉大学大学院薬学研究院病態分析化学研究室

(〒260-8675 千葉市中央区亥鼻1-8-1)

連絡先 西村和洋、e-mail: kaznishi@faculty.chiba-u.jp

## 1. はじめに

蛋白質合成開始因子eIF5Aは翻訳後修飾によってハイプシンというユニークなアミノ酸残基が合成される蛋白質である。そして、その合成にはスペルミジンが基質として使われるため、ポリアミン研究における重要性は言うまでもない。本総説では特にeIF5Aとハイプシンの入門書的な内容でハイプシンの発見から最近の動向まで、簡単に紹介していきたい。

## 2. ハイプシンとeIF5Aの発見

ハイプシンを初めて発見したのは日本人研究者であることは知っているだろうか。阪大の芝らは1971年にウシ脳から分離し、構造決定した新しいアミノ酸の構成が"hydroxyputrescine and lysine"であったことから"hypusine"と名付けている<sup>1-2)</sup>。発見後すぐに、ハイプシンは蛋白質中のリジン残基が修飾されて合成されることが報告されたが<sup>3)</sup>、その蛋白質が特定されるまでには約10年ほどの時間を要した<sup>4)</sup>。その間の1976年には、後のeIF5Aとなる蛋白質が、ウサギ網状赤血球からメチオニル-ピユーロマイシン反応を促進するIF-M2B $\alpha$ として同定されている<sup>5)</sup>。この蛋白質は1989年に国際生化学連合がeIF5Aに名称を変更するまでeIF-4Dと呼ばれた開始因子であり、PubMedでeIF5Aの論文を検索するとeIF-4Dの論文も引っ掛かる理由がここにある。

1981-1983年には、ハイプシンの合成にスペルミジンのブチルアミン部分が供給されること、ハイプシン合成と細胞増殖の相関性、そしてハイプシン合成される蛋白質がeIF-4Dであることなどが米国

NIHのグループにより明らかにされた<sup>4,6-7)</sup>。当時から現在までもこの研究グループの中心人物としてPark博士がおり、筆者も留学先としてお世話になった研究室である。

## 3. ハイプシン合成を担う2つの酵素

1982年に、eIF5Aのハイプシン合成は中間体であるデオキシハイプシンをヒドロキシル化する2ステップの反応であることが分かり、それらの反応を担う酵素が徐々に明らかとなっていった(図1<sup>8-11)</sup>)。1ステップ目を担うデオキシハイプシン合成酵素(DHS)はNAD<sup>+</sup>依存性であり、至適pHが9.3という塩基性条件を好む酵素である。2ステップ目を担うデオキシハイプシン水酸化酵素(DOHH)は至適pHは中性であるが、Fe(II)結合型のメタロ酵素である。また、蛋白質間相互作用モチーフのひとつであるHEATリピート構造を持っている。

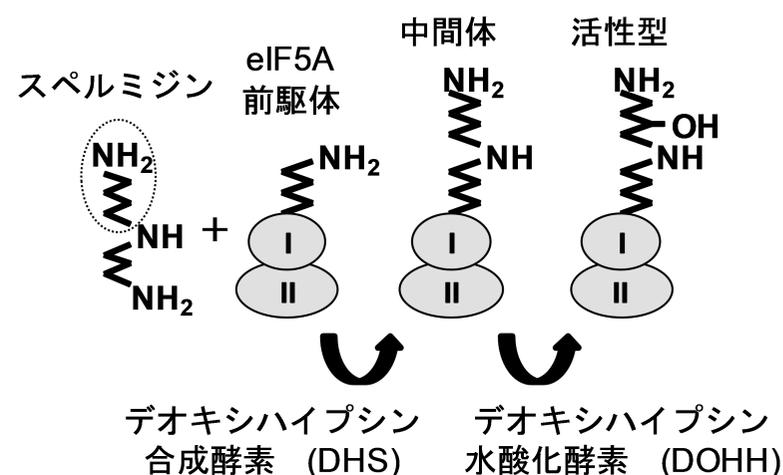


図1. eIF5Aの翻訳後修飾 (ハイプシン化)

ヒトeIF5A蛋白質の場合、スペルミジンのn-ブチルアミン部分をDHSによって50番目のリジン残基に転移する。その後、DOHHによりヒドロキシル化されて活性型のeIF5Aとなる。

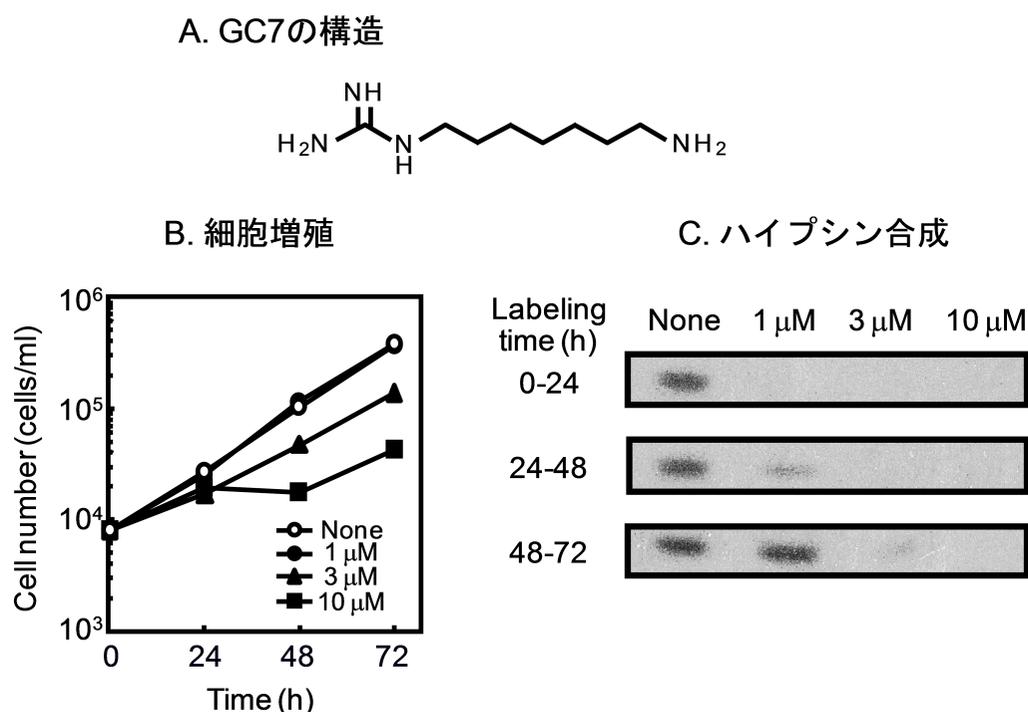


図2. GC7依存的な細胞増殖とハイプシン合成の阻害

マウスFM3A細胞に対して、DHS阻害剤であるGC7 (A) を添加し、細胞増殖 (B) とハイプシン合成 (C) の阻害効果を測定した。ハイプシン合成は<sup>3</sup>H標識スペルミジンが取り込まれたeIF5Aをフルオログラフィーで検出した。細胞増殖もハイプシン合成もGC7濃度依存的に阻害されるが、1 μM GC7では培養開始後24時間でハイプシン合成が完全に阻害されていても以降、阻害剤としての効果が持続せず、細胞増殖阻害が現れなかった。

酵素の研究を進めるにあたり、特異的阻害剤の存在は欠かせないであろう。特にDHSの阻害剤研究において見出された *N*<sup>1</sup>-guanyl-1,7-diaminoheptane (GC7) は世界中の多くの研究者がハイプシン合成阻害剤として用いている<sup>12)</sup>。GC7はスペルミジンアナログであり、細胞株にもよるが数 μMのような低濃度で新規ハイプシン合成を阻害し、増殖阻害効果を発揮する。しかし、意外と代謝を受けて不活化しやすい阻害剤でもある (図2)。DOHHの阻害剤としてはミモシンというアルカロイドが有効との報告はあるが効果に要する濃度も高く、その特異性については不明な点が多いと感じる<sup>13)</sup>。

#### 4. eIF5Aは生命の必須因子

1990年代になり、eIF5A研究も遺伝子クローニングが進み、特に酵母を用いた遺伝学的解析を軸として進められてきた。その結果、2つのeIF5A遺伝子 (*TIF51A*, *TIF51B*) 及びDHS遺伝子の欠損株の表現型は致死性を示すことが明らかにされたが<sup>14-15)</sup>、

DOHH遺伝子の欠損株は致死性を示さずに増殖の低下が見られるだけであることが2006年に報告されている<sup>16)</sup>。酵母は真核生物とはいえ単細胞生物である。そこで、筆者は遺伝子欠損マウスの作製により多細胞生物での表現型の解析を試みた。マウスでも酵母と同様、2つのeIF5A遺伝子 (*Eif5a1*, *Eif5a2*)、DHS遺伝子及びDOHH遺伝子が存在する。ジーントラップ法を用いてeIF5A-1とDHS遺伝子の欠損マウスの作製に成功した結果、酵母と同じく両マウスとも胚性致死という表現型を示した<sup>17-18)</sup>。また、DOHH遺伝子の場合もショウジョウバエ及びマウスで胚性致死との表現型であることが報告された<sup>19-20)</sup>。eIF5A-2に関する欠損マウスの報告はまだないが、全ての組織で恒常的に発現するeIF5A-1と異なり、発現パターンに組織特異性があることから、致死性ではない表現型が現れる可能性もある。2004年に線虫で作製された二つのeIF5Aホモログ変異体解析の結果では、IFF-2 (eIF5A-1ホモログ) は体細胞の増殖に、IFF-1 (eIF5A-2ホモログ) は生殖細胞の増殖にそれぞれ必要とされて

いることから<sup>21)</sup>、eIF5A-2欠損マウスは不妊を示すような表現型が現れる可能性を筆者は考えている。

### 5. eIF5Aとポリアミンの独立した機能

eIF5Aもポリアミンも細胞増殖の必須因子であり、大変よく似ている。実際、ポリアミン合成の阻害は間接的にハイプシン合成の阻害を引き起こすことになる<sup>22-23)</sup>。すなわち、ポリアミンの機能とはeIF5Aの機能で説明がつくかもしれない。筆者はこのような疑問を解決するための検討を行った。ポリアミン合成阻害剤として代表的な $\alpha$ -difluoromethylornithine (DFMO) 存在下で細胞培養を行うとプトレッシンとスペルミジンは完全に枯渇するので、同時にハイプシン合成も阻害を受けることになる。そこで、スペルミン合成酵素阻害剤である*N*-(3-aminopropyl)cyclohexylamine (APCHA) とDFMOの共存下で細胞培養を行うと、スペルミジンの緩やかな低下によりハイプシン

合成阻害を伴わない細胞増殖阻害を引き起こした。つまり、ポリアミン量低下による増殖阻害とハイプシン合成阻害による増殖阻害メカニズムは異なることが明らかとなった (図3)<sup>24)</sup>。

### 6. eIF5Aは翻訳の伸長因子?

前述したとおり、eIF5Aはメチオニル-ピューロマイシン反応を促進する因子として、すなわち翻訳における最初のペプチド合成を促進する因子であったことから開始因子の名が付いていた。しかし、その後の研究によって翻訳の開始段階の必須因子ではないことが明らかとなり<sup>25)</sup>、さらにeIF5Aの機能としてHIV-1 Revのコファクター、mRNAの輸送及び安定化など、翻訳段階とは異なる機能が報告された<sup>26-28)</sup>。そして、2009年にeIF5Aは翻訳の開始段階ではなく伸長段階に機能するという大きなトピックが報告された<sup>29-30)</sup>。そもそも、このようなトピックが出てきた背景にはバクテリアの翻訳伸長因子EF-

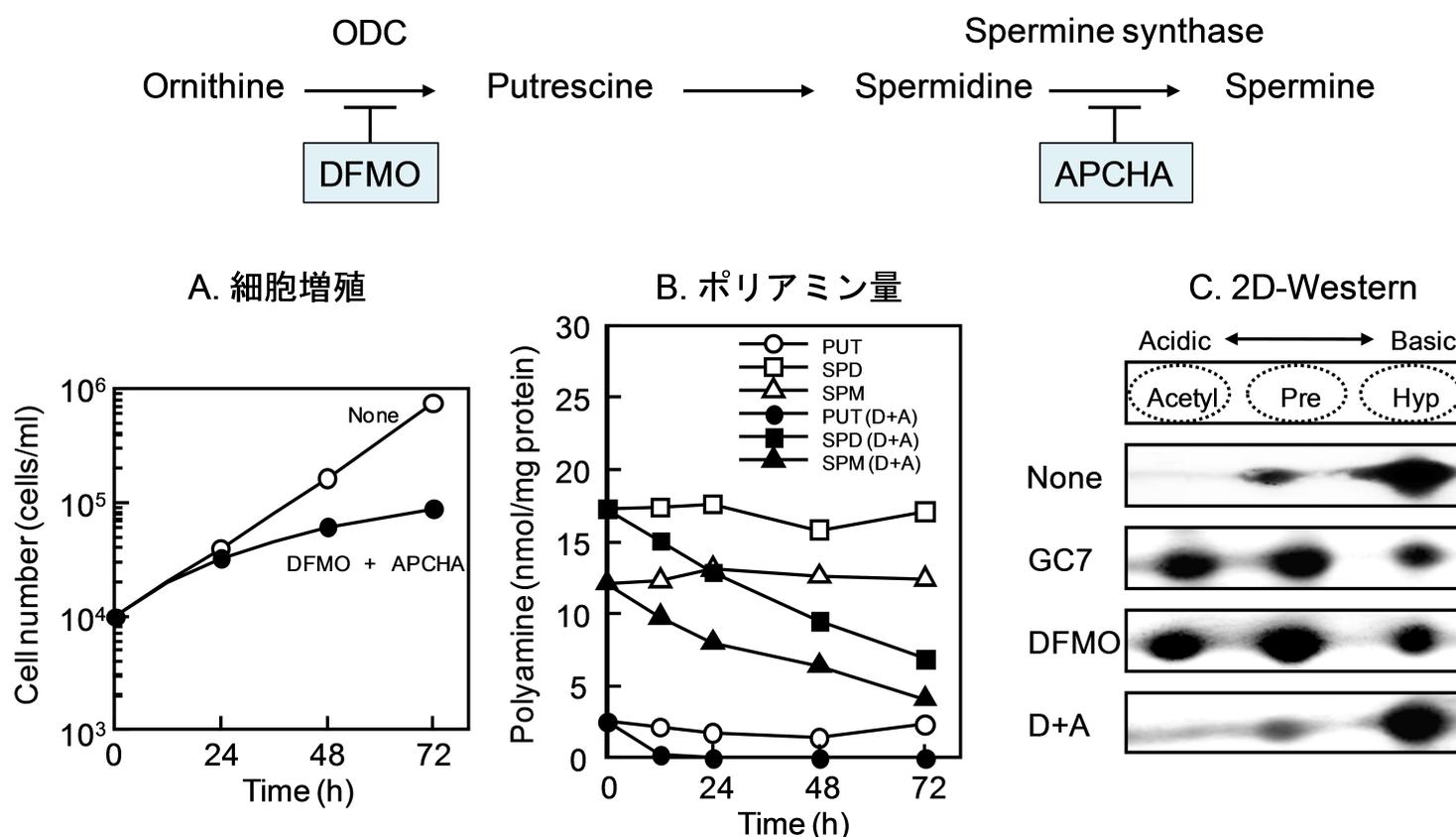


図3. ポリアミンとeIF5Aは細胞増殖において独立した機能を持つ

DFMO (50  $\mu$ M) とAPCHA (150  $\mu$ M) の共存下でマウスFM3A細胞の培養を3日間行った。その結果、細胞増殖阻害 (A) と緩やかなポリアミン量の低下 (B) が見られた。細胞内のハイプシン化eIF5A量を二次元電気泳動後のウェスタンブロットで検出した (C)。その結果をコントロール、GC7、DFMO及びDFMO+APCHA (D+A) 存在下で比べるとDFMO+APCHA存在下でのハイプシン化eIF5A量はコントロールと同様、変化がなかった。DFMOを単独で用いた場合、ハイプシン合成の阻害も含む結果となることを留意する必要がある。

PがeIF5Aのホモログであり、蛋白質としての立体構造も非常にそっくりであったことから (図4) 31-32)、EF-PとeIF5Aの機能は同じである可能性が示唆され、研究が進んできた。その結果、eIF5AはEF-Pと同様にポリプロリンを含む蛋白質の翻訳促進に寄与するとの報告に至っている<sup>33-35)</sup>。

## 7. おわりに

最近の知見から、翻訳におけるeIF5Aの機能は開始因子から伸長因子へと大きく舵を切り始めている。何度も改名してきたeIF5Aだが、次の新しい名前としてeEF5との提唱もすでにされている<sup>36)</sup>。近い将来、このような改名は実現するであろうか? 今後のeIF5A研究の展開が更に注目されていくことを期待したい。

## 参考文献

1. Shiba T, Mizote H, Kaneko T, Nakajima T, Kakimoto Y, & Sano I: Hypusine, a new amino acid occurring in bovine brain. Isolation and structural determination. *Biochim Biophys Acta* 244: 523-531 (1971)
2. 柿本泰男: 脳とポリアミン. *代謝* 9: 1051-1057 (1972)
3. Imaoka N, & Nakajima T: Hypusine, *N*<sup>6</sup>-(4-amino-2-hydroxybutyl)-2,6-diaminohexanoic acid, in tissue proteins of mammals. *Biochim Biophys Acta* 320: 97-103 (1973)
4. Park MH, Cooper HL, & Folk JE: Identification of hypusine, an unusual amino acid, in a protein from human lymphocytes and of spermidine as its biosynthetic precursor. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2869-2873 (1981)
5. Kemper WM, Berry KW, & Merrick WC: Purification and properties of rabbit reticulocyte protein synthesis initiation factors M2Balpha and M2Bbeta. *J Biol Chem* 251: 5551-5557 (1976)
6. Cooper HL, Park MH, & Folk JE: Posttranslational formation of hypusine in a

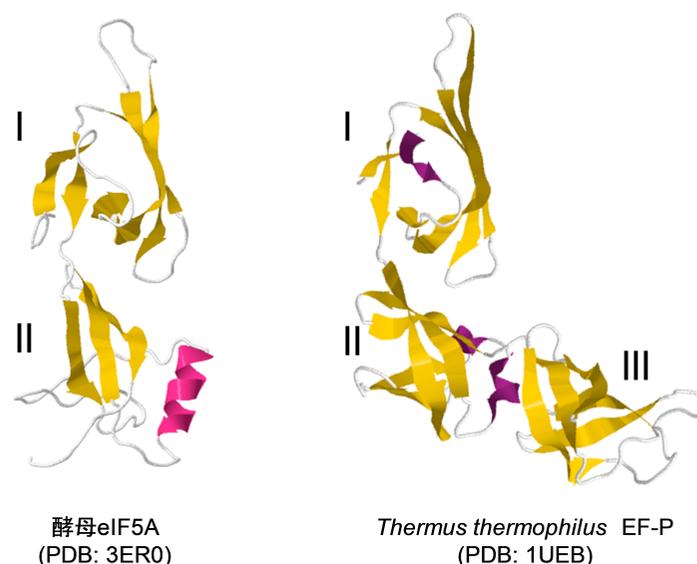


図4. eIF5AとEF-Pの立体構造の類似性

eIF5A (左側) はN末のドメインI及びC末のドメインIIに区別できる。*Thermus thermophilus* EF-P (右側) はドメインIからIIIに区別できる。EF-PのドメインIIIを除くとお互いが非常に似た立体構造を持つことがわかる。

single major protein occurs generally in growing cells and is associated with activation of lymphocyte growth. *Cell* 29: 791-797 (1982)

7. Cooper HL, Park MH, Folk JE, Safer B, & Braverman R: Identification of the hypusine-containing protein hy+ as translation initiation factor eIF-4D. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 1854-1857 (1983)
8. Park MH, Cooper HL, & Folk JE: The biosynthesis of protein-bound hypusine (N epsilon -(4-amino-2-hydroxybutyl)lysine). Lysine as the amino acid precursor and the intermediate role of deoxyhypusine (N epsilon -(4-aminobutyl)lysine). *J Biol Chem* 257: 7217-7222 (1982)
9. Murphey RJ, & Gerner EW: Hypusine formation in protein by a two-step process in cell lysates. *J Biol Chem* 262: 15033-15036 (1987)
10. Chen KY, & Dou QP: NAD<sup>+</sup> stimulated the spermidine-dependent hypusine formation on the 18 kDa protein in cytosolic lysates derived from NB-15 mouse neuroblastoma cells. *FEBS Lett* 229: 325-328 (1988)

11. Abbruzzese A, Park MH, & Folk JE: Deoxyhypusine hydroxylase from rat testis: partial purification and characterization. *J Biol Chem* 261: 3085-3089 (1986)
12. Jakus J, Wolff EC, Park MH, & Folk JE: Features of the spermidine-binding site of deoxyhypusine synthase as derived from inhibition studies. Effective inhibition by bis- and mono-guanylated diamines and polyamines. *J Biol Chem* 268: 13151-13159 (1993)
13. Hanauske-Abel HM, Park MH, Hanauske AR, Popowicz AM, Lalande M, & Folk JE: Inhibition of the G1-S transition of the cell cycle by inhibitors of deoxyhypusine hydroxylation. *Biochim Biophys Acta* 1221: 115-124 (1994)
14. Schnier J, Schwelberger HG, Smit-McBride Z, Kang HA, & Hershey JW: Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 11: 3105-3114 (1991)
15. Sasaki K, Abid MR, & Miyazaki M: Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 384: 151-154 (1996)
16. Park JH, Aravind L, Wolff EC, Kaevel J, Kim YS, & Park MH: Molecular cloning, expression, and structural prediction of deoxyhypusine hydroxylase: a HEAT-repeat-containing metalloenzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 51-56 (2006)
17. Park MH, Nishimura K, Zanelli CF, & Valentini SR: Functional significance of eIF5A and its hypusine modification in eukaryotes. *Amino Acids* 38: 491-500 (2010)
18. Nishimura K, Lee SB, Park JH, & Park MH: Essential role of eIF5A-1 and deoxyhypusine synthase in mouse embryonic development. *Amino Acids* 42: 703-710 (2012)
19. Patel PH, Costa-Mattioli M, Schulze KL, & Bellen HJ: The *Drosophila* deoxyhypusine hydroxylase homologue nero and its target eIF5A are required for cell growth and the regulation of autophagy. *J Cell Biol* 185: 1181-1194 (2009)
20. Sievert H, Pällmann N, Miller KK, Hermans-Borgmeyer I, Venz S, Sendoel A, Preukschas M, Schweizer M, Boettcher S, Janiesch PC, Streichert T, Walther R, Hengartner MO, Manz MG, Brümmendorf TH, Bokemeyer C, Braig M, Hauber J, Duncan KE, & Balabanov S: A novel mouse model for inhibition of DOHH-mediated hypusine modification reveals a crucial function in embryonic development, proliferation and oncogenic transformation. *Dis Model Mech* 7: 963-976 (2014)
21. Hanazawa M, Kawasaki I, Kunitomo H, Gengyo-Ando K, Bennett KL, Mitani S, & Iino Y: The *Caenorhabditis elegans* eukaryotic initiation factor 5A homologue, IFF-1, is required for germ cell proliferation, gametogenesis and localization of the P-granule component PGL-1. *Mech Dev* 121: 213-224 (2004)
22. Byers TL, Ganem B, & Pegg AE: Cytostasis induced in L1210 murine leukaemia cells by the S-adenosyl-L-methionine decarboxylase inhibitor 5'-([Z]-4-amino-2-butenyl)methylamino)-5'-deoxyadenosine may be due to hypusine depletion. *Biochem J* 287: 717-724 (1992)
23. Tome ME, & Gerner EW: Hypusine modification in eukaryotic initiation factor 5A in rodent cells selected for resistance to growth inhibition by ornithine decarboxylase-inhibiting drugs. *Biochem J* 320: 55-60 (1996)
24. Nishimura K, Murozumi K, Shirahata A, Park MH, Kashiwagi K, & Igarashi K: Independent roles of eIF5A and polyamines in cell proliferation. *Biochem J* 385: 779-785 (2005)
25. Kang HA, & Hershey JW: Effect of initiation factor eIF-5A depletion on protein synthesis and proliferation of *Saccharomyces*

- cerevisiae. J Biol Chem 269: 3934-3940 (1994)
26. Ruhl M, Himmelspach M, Bahr GM, Hammerschmid F, Jaksche H, Wolff B, Aschauer H, Farrington GK, Probst H, Bevec D, & Hauber J: Eukaryotic initiation factor 5A is a cellular target of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain mediating trans-activation. J Cell Biol 123: 1309-1320 (1993)
27. Lipowsky G, Bischoff FR, Schwarzmaier P, Kraft R, Kostka S, Hartmann E, Kutay U, & Görlich D: Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. EMBO J 19: 4362-4371 (2000)
28. Zuk D, & Jacobson A: A single amino acid substitution in yeast eIF-5A results in mRNA stabilization. EMBO J 17: 2914-2925 (1998)
29. Gregio AP, Cano VP, Avaca JS, Valentini SR, & Zanelli CF: eIF5A has a function in the elongation step of translation in yeast. Biochem Biophys Res Commun 380: 785-790 (2009)
30. Saini P, Eyler DE, Green R, & Dever TE: Hypusine-containing protein eIF5A promotes translation elongation. Nature 459: 118-121 (2009)
31. Aoki H, Dekany K, Adams SL, & Ganoza MC: The gene encoding the elongation factor P protein is essential for viability and is required for protein synthesis. J Biol Chem 272: 32254-32259 (1997)
32. Hanawa-Suetsugu K, Sekine S, Sakai H, Hori-Takemoto C, Terada T, Unzai S, Tame JR, Kuramitsu S, Shirouzu M, & Yokoyama S: Crystal structure of elongation factor P from *Thermus thermophilus* HB8. Proc Natl Acad Sci USA 101: 9595-9600 (2004)
33. Ude S, Lassak J, Starosta AL, Kraxenberger T, Wilson DN, & Jung K: Translation elongation factor EF-P alleviates ribosome stalling at polyproline stretches. Science 339: 82-85 (2013)
34. Doerfel LK, Wohlgemuth I, Kothe C, Peske F, Urlaub H, & Rodnina MV: EF-P is essential for rapid synthesis of proteins containing consecutive proline residues. Science 339: 85-88 (2013)
35. Gutierrez E, Shin BS, Woolstenhulme CJ, Kim JR, Saini P, Buskirk AR, & Dever TE: eIF5A promotes translation of polyproline motifs. Mol Cell 51: 35-45 (2013)
36. Dever TE, Gutierrez E, & Shin BS: The hypusine-containing translation factor eIF5A. Crit Rev Biochem Mol Biol 49: 413-425 (2014)



# トランスグルタミナーゼとポリアミン

人見 清隆

名古屋大学大学院創薬科学研究科

ポリアミンを研究対象とされる方々にトランスグルタミナーゼ（タンパク質架橋化酵素）を紹介する機会を頂いた。トランスグルタミナーゼはタンパク質の翻訳後修飾のひとつとしての「架橋形成」を行う酵素で、その生理機能は多彩である<sup>1-4</sup>。

私はこれまでもポリアミン学会に何度か参加してお世話になり、そのユニークな存在様式や生理的役割を見るにつけて、ポリアミンを基質にできる可能性のある酵素であるトランスグルタミナーゼとの関わりに興味を持ってきた。本稿では、そのご縁もあってこの酵素の紹介をさせて頂くと共に、これまで見つかってきた本酵素とポリアミンに関連した知見や連携の可能性も含めて述べたい。

## 1 トランスグルタミナーゼの基本反応と存在：なぜポリアミンが基質になりうるのか？

トランスグルタミナーゼは、微生物から動植物まで幅広い生物種で見られるが、酵素の構造はそれぞれで大きく異なっており、遺伝子としての起源は共通しないと思われる。なお、「トランスグルタミナーゼ」というネーミングからは、聞いただけでは反応形式が容易に思い浮かべにくい酵素である。この酵素の最も典型的な反応様式は図1に示すとおり、タンパク質中の（フリーでなくタンパク質中の）グルタミン残基とリジン残基との間に、イソペプチド結合と呼ばれる不可逆な架橋の形成反応を触媒する。このように二つの分子を基質にする酵素の

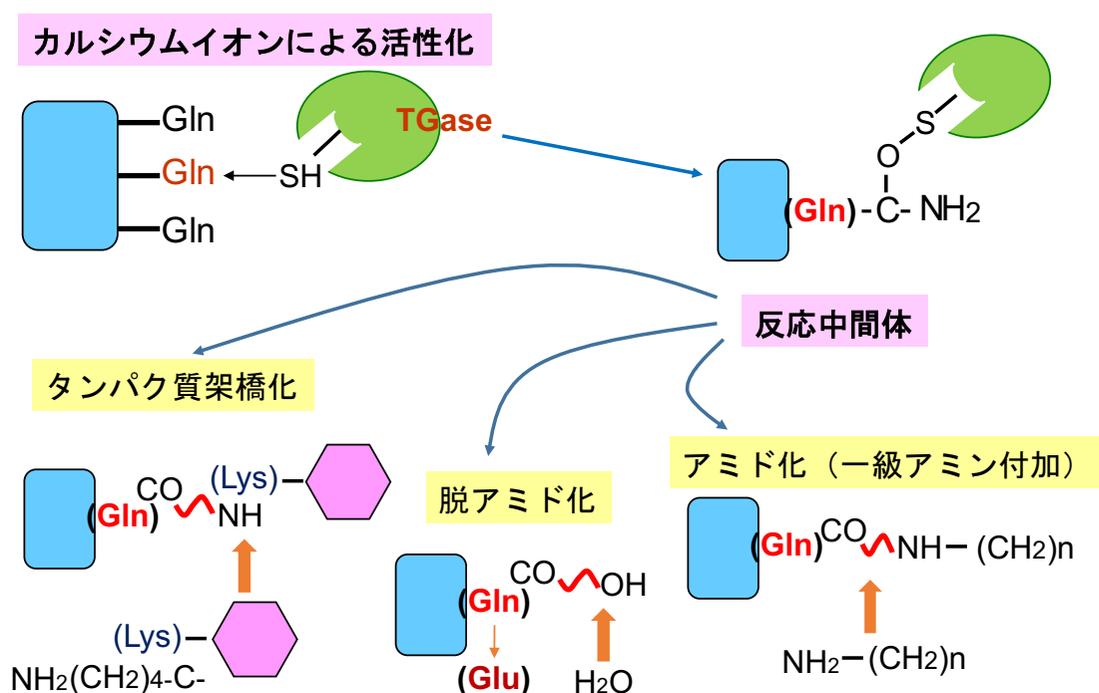


図1 トランスグルタミナーゼの反応機構

カルシウムイオンの存在で、トランスグルタミナーゼは構造変化を起こして活性部位（シスタミン残基）が露出し活性化する。基質タンパク質のグルタミン残基と活性化酵素の間に中間体が形成され、これが同種または異種の基質タンパク質と反応する（架橋化）。水分子と作用すると始めに反応した基質のグルタミン残基がグルタミン酸に変換される（脱アミド化）。ポリアミンを含む一級アミンと反応すると、これをグルタミン残基に取り込んだ形になる（アミド化）。

場合、どちらが先に酵素-基質の反応中間体ができるのか、ということが重要であるが、トランスグルタミナーゼの場合は、まずグルタミン残基と酵素との間にチオエステル結合が生じる。そのあと、この中間体が生じるリジン残基 ( $\epsilon$ -アミノ基) に求電子反応を行う。この反応中間体が生じるリジン残基と結合すればタンパク質どうしの接着架橋である (図1左)。しかしながら条件によっては、リジン残基の  $\epsilon$ -アミノ基でなく一級アミンに対して同じ様式で結合することもある (図1右)。こうなると、グルタミン残基にはアミンが共有結合することになる。例えばこの中で、ポリアミンの一級アミノ基を通じて基質タンパク質のグルタミン残基にこの酵素反応で結合すれば、タンパク質はそれ自体がより正電荷を持つことになる。さらには、水分子のみが作用してグルタミン酸残基に変換される場合もある (図1中)。このようなトランスグルタミナーゼによる修飾から *in vivo*, *in vitro* で、構造・機能ともにタンパク質が機能変換されることになる。

トランスグルタミナーゼはヒトでは8種類 (TG1~TG7, Factor XIII A) の酵素群からなるファミリーである。ゲノムの情報からは8種類のアイソザイム (同じ酵素反応に携わる異なるタンパク質) と一つの不活性型の酵素様の構造タンパク質 (赤血球に存在するBand 4.2) に分けられる。このうちヒトでの主要なメンバーとしては、TG1, TG2, TG3, Factor XIII Aである。他のアイソザイムについては、発現量が低いこともあり、機能について研究成果は少ない。酵素はいずれもカルシウムイオンが結合しないとスイッチが入らないしくみになっているが、微生物由来のものはそうではない (ここで言う微生物とは報告のある、放線菌や枯草菌由来のものである)。今回はあまりふれないが、微生物のトランスグルタミナーゼとして放線菌由来の酵素が、大量に分泌タンパク質として得ることができるために大量生産されており、例えば、ねり製品などの食品の粘弾性を調節するなど産業利用されている<sup>5)</sup>。

それぞれの生理機能の詳細は後述するが、TG1とTG3は、皮膚表皮や毛 (毛胞) のタンパク質を架

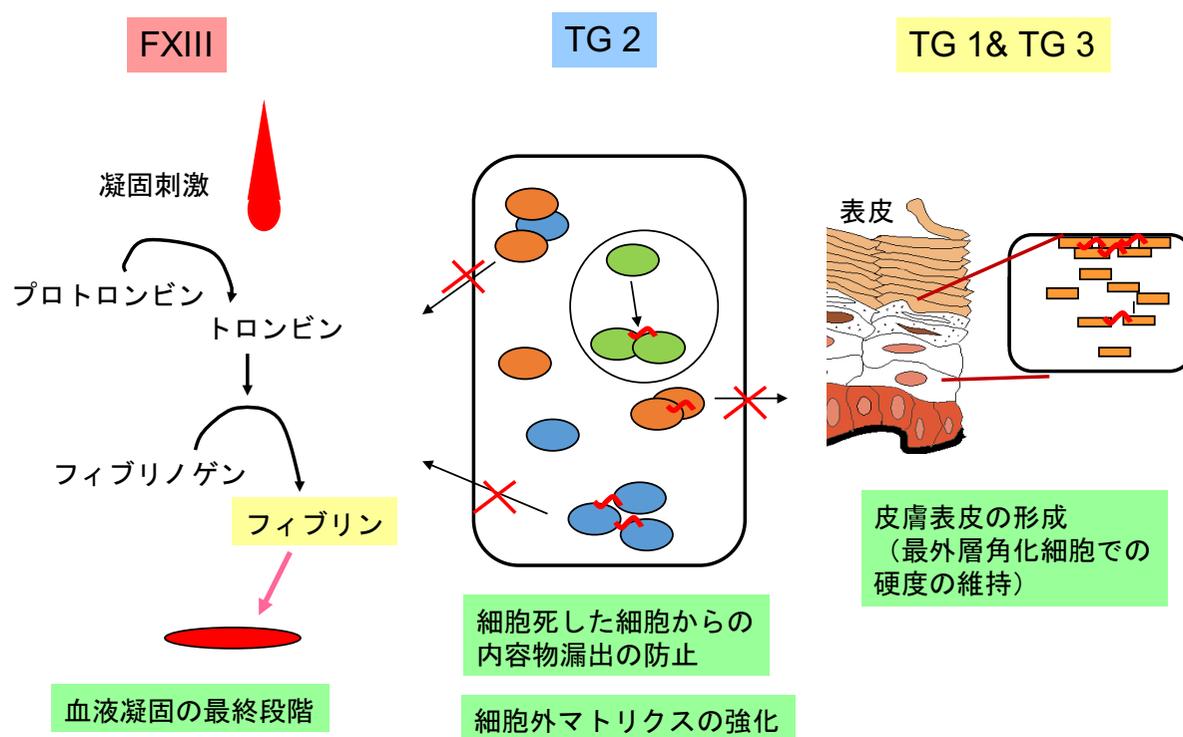


図2 主要なトランスグルタミナーゼの生理機能

FXIII A (FXIIIと表示) は不活性な前駆体でかつ二量体で存在する。トロンビンの作用を受け、N末端側1箇所が特異的な限定分解を受けて活性化する。フィブリンを架橋することによって、これをより強固に安定化する。TG2は細胞死に伴い活性化し、細胞の内容物露出を防ぐことを始め、多彩な機能を発揮するが、全容はまだ解明されない。TG1およびTG3 (TG5, TG6も参照するとされている)は、皮膚表皮細胞の分化に伴って活性化され、皮膚表皮細胞内の様々な構造タンパク質を架橋重合する。その産物が細胞膜直下に集積し、皮膚の硬度に貢献する。

橋重合化して高分子構造体を細胞膜に造り上げ、硬度形成に働いている (図2右)。TG2は多様な役割を有し、例えば細胞死や細胞外マトリクス強化等に関わる (図2中)。Factor XIII A (血液凝固第十三因子) は血液凝固の最終段階で作用し、フィブリン重合化に必須である (図2左)。ということで、一般の方々にはこの酵素のことを、「ケガをしてかさぶたができるのも、かかるとが硬いのも、かまぼこを硬くするのも、同じ酵素反応なのですよ。」とやや大雑把な表現で説明をすることもありますが、本当である。

反応に話を戻すと、酵素により架橋される基質タンパク質は何でもよいのではなく、それぞれのアイソザイムには基質特異性がある選り好みをしている<sup>6-7)</sup>。さらにそれぞれの酵素反応においても、基質タンパク質中のどのグルタミン残基も反応に加わるわけではない。先述したように初発段階で特定のグルタミンと酵素の間で反応中間体ができるために、グルタミン残基とその周辺構造が、酵素の反応性や特異性を決定していることになる。その後の反応として、選択性は低いものの、反応中間体は次の段階の基質分子と結びつく。ポリアミンなどの一級アミノ基を持つ分子と反応するのか、あるいは水分子と反応するのか、タンパク質中のリジン残基と反応するのかの正確な決定機構はまだ不明であるが、pHや濃度に左右されているという報告がある<sup>8)</sup>。

## 2 トランスグルタミナーゼの基質と生理機能

すべての8つのアイソザイムについての生理機能はまだまだ解明にはほど遠い。特にTG4からTG7については、存在量の低さもあって研究があまりされておらず、本稿では主要なアイソザイム群について、いくつか明確な生理機能とされるものに限定して紹介したい。

Factor XIII Aは血漿および血小板に存在して、血液凝固カスケードの最終段階、すなわちフィブリン重合を強固にすることで、かさぶたの形成に必須である<sup>9-10)</sup>。この際、Factor XIII Aはトロンビンによる切断を受けないと不活性な状態の前駆体のままであり、血液中ではBサブユニット (Factor XIII B)

という相棒と相互作用しながら血中を漂っている。予想されるようにこのノックアウトマウスについては血液凝固の異常や、さらには流産しやすい等の表現型が現れている。血液凝固に影響を与えるポリアミン、というのがあるのかはわからない。

TG1 とTG3 が皮膚形成に関わることは前述のとおりである<sup>11-12)</sup>。表皮の形成は真皮との境目に存在する未分化な基底細胞が、棘皮細胞→顆粒細胞→角化細胞へと細胞形態の違いが明らかな層としての形成段階を経て成熟していく。この制御自体は細胞に対しての分化増殖因子の巧妙な働きによって上手に行なわれているが、細胞内ではトランスグルタミナーゼの働きで劇的な変化が起こる。図2に示したように、細胞質に存在する多種の基質としての構造タンパク質 (特定の機能をもたずに存在する：インボルクリン、ロルクリン、スモールプロリンリッチタンパク質、ケラチンなど) が順序良く架橋重合される。これらの最終産物としての重合体は、細胞膜を裏打ちするような形でセラミドで形成される特殊な細胞膜の内側に集積する。この現象は主に、顆粒細胞の段階で活発であるが、これらのタンパク質群の正確な架橋様式はいまだに不明である。我々は、表皮培養系を用いてこの産物形成を明らかにしつつある。TG1は細胞膜にぶらさがった形で、TG3は細胞質に主に存在しており、それぞれが役割分担をしながら、必要な架橋形成を基質を異にしている。トランスグルタミナーゼの発現や活性レベルは、皮膚表皮の分化に伴いドラチックな変化 (制御) をしており、ポリアミンの細胞内濃度等に変動がみられるのかどうか興味のあるところで、表皮における働きにつながれば面白い。

TG2 は一言で括ることのできない多彩な働きを有するとともに、架橋酵素反応以外の役割としてGTP結合タンパク質やフィブロネクチン相互作用因子の機能を併せ持つなど、謎の多いアイソザイムである<sup>13)</sup>。発現する細胞の種類が多彩であるのみならず、細胞膜上、細胞外、細胞質、核とその局在も広く (シグナルペプチドがないにも関わらず)、ポリアミンと相互作用をする可能性は高いのではないかと考える。このアイソザイムは転写因子 (Sp1,

Rb) や受容体の架橋化を行なってその生物活性を抑制 (というより不可逆的に阻害) する作用がある<sup>14)</sup>。核にとりわけ濃度が高いポリアミンが、必要な場合に転写制御因子の不活化を妨げるようなことがあればおもしろいのであるが、今のところそのような視点からの研究はない。細胞外では、細胞外マトリクスタンパク質を架橋することで安定化するなど、主として組織の構築に携わる。同時に細胞や組織が傷害を受けた際に、活性化されることが多い。

高等動物においては、これらトランスグルタミナーゼの機能の中でポリアミンを基質として機能と明確に関係を証明するものはまだ報告がないが、ポリアミン濃度の高い組織や細胞では、グルタミン残基を受容する基質として用いられる可能性がある。

### 3 ポリアミンとトランスグルタミナーゼの生理的な関与

そのような状況であるが、植物では、トランスグルタミナーゼによるいくつかのポリアミンとタンパク質架橋の報告があり、また、高等動物でもポリアミン代謝物との関係が示唆されている報告があるので紹介する。

#### 3-1 脳梗塞におけるアクロレインとトランスグルタミナーゼの関連<sup>15)</sup>

スペルミンからの代謝物としてのアクロレインやその産生酵素が、脳梗塞の際には重要なマーカーとなる。これに関連して、五十嵐・小嶋グループにより、国内では初めて共同研究でポリアミンとトランスグルタミナーゼの接点になる研究成果が報告された。アクロレイン自体はTG2の基質ではないが、報告では、TG2の欠損マウスを用いて脳梗塞時に見られるタンパク質に抱合されてしまうアクロレインの量を解析し、欠損マウスや架橋化酵素阻害剤投与の場合には減少することを示している。一方で合成に関わる酵素(SSAT: spermidine/spermine N<sup>1</sup>-acetyltransferase) の活性がTG2欠損マウスや阻害剤投与の場合には低くなることも示している。他組織でも似たような現象がみられるのかどうか、何かヒントになるような現象があれば興味深い。

#### 3-2 植物トランスグルタミナーゼのポリアミン化による制御<sup>16-18)</sup>

ポリアミンがトランスグルタミナーゼの基質となることに関する一連の研究が、Del Luca らにより報告されている。実は植物のトランスグルタミナーゼは、カルシウムイオン依存性であるものの高等動物や微生物の酵素とは相同性が低く、分子量や立体構造レベルでも似通っていない。細胞死・老化を対象に研究が展開されているものの、そのまま動物酵素の架橋反応の意義があてはまるのかどうかは不明である。これまでに、トランスグルタミナーゼによって、ポリアミン類がRubisco (二酸化炭素の固定をする、炭素固定の律速酵素) を始め様々なタンパク質に抱合 (架橋) されていることや、老化と共に酵素やポリアミン類が変動することが現在明らかになっている。しかしこれらの修飾が結果的にどのような機能変換に至るのかはまだ明確ではない。

#### 4 セロトニン化による動物での制御<sup>19, 20)</sup>

ポリアミンではなく一級アミンであるが、動物ではセロトニン化によるタンパク質の機能変換の報告が最も多い (加えてヒスタミン化についても報告がある)。その対象となるのは、small GTP protein (RhoAなど) である。いずれもトランスグルタミナーゼにより活性部位にセロトニンが付加されることによる (抑制) 制御である。また、フィブロネクチンにも取り込まれることが知られている。ただし、これらのタンパク質に付加修飾が生じてヒスタミンやセロトニンの本来の機能がタンパク質にそのまま付与されるというより、単に一級アミンとしてタンパク質が修飾されるだけである。

#### 5 終わりに

ポリアミンは *in vitro* ではトランスグルタミナーゼ活性を制御しうる可能性があり、今後不明な制御機構があれば、ポリアミンの関与を考えてみる価値はある。一方で、特定分子にポリアミンを付与することで、タンパク質の活性に影響を与えるべく電荷を正にするような応用的な研究も可能であるかもしれない。脱アミド化や架橋反応に留まらず、この分

子同士が相互に制御するような現象の発見も見逃さないようにしたい。また近年は、トランスグルタミナーゼが関与する疾患に対して有効な薬剤として、トランスグルタミナーゼの阻害剤が競争的に開発され始めている。反応中間体に対して強い親和性を有するポリアミンがあれば、不要なタンパク質架橋を抑制することで阻害剤のシーズにならないかと考えている。

#### 参考文献

1. Lorand L and Graham RM: Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 140-156 (2003)
2. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM.: Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. *Physiol Rev* 89: 991-1023 (2009)
3. Eckert RL, Kaartinen MT, Nurminskaya M, Belkin AM, Colak G, Johnson GV, Mehta K: Transglutaminase regulation of cell function. *Physiol Rev* 94 :383-417 (2014)
4. Hitomi K, Kojima S, Fesus L Ed. Transglutaminase: Multiple Functional Modifiers and Targets for New Drug Discovery. Springer (2016) ISBN978-4-431-55823-1
5. Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y: Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol* 64: 447-454 (2004)
6. Esposito C, Caputo I: Mammalian transglutaminases. Identification of substrates as a key to physiological function and pathophysiological relevance. *FEBS J* 272: 615-631 (2005)
7. 人見清隆：タンパク質架橋化酵素の高反応性基質配列の探索と活用 *生化学* 81: 708-711 (2009)
8. Fleckenstein B, Molberg Ø, Qiao SW, Schmid DG., von der Mulbe F., Elgstoen K, Jung G, Sollid LM: Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. Role of enzyme specificity and pH influence on the transamidation versus deamidation process. *J Biol Chem* 277: 34109-34116 (2002)
9. Ichinose A: Physiopathology and regulation of Factor XIII. *Thromb Haemost* 86: 57-65 (2001)
10. Muszbek L, Bereczky Z, Bagoly Z, Komáromi I, Katona É: Factor XIII, a coagulation factor with multiple plasmatic and cellular functions. *Physiol. Rev* 91: 931-972 (2011)
11. Candi E, Schmidt R, Melino G: The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Bio* 6: 328-340 (2005)
12. Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M, Rorke EA: Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124: 481-12492 (2005)
13. Fesus L, Piacentini M: Transglutaminase 2, An enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends in Biochem Sci* 27: 534-539 (2002)
14. Tatsukawa H, Fukaya Y, Frampton G, Martinez-Fuentes A, Suzuki K, Kuo TF, Nagatsuma K, Shimakado K, Okuno M, Wu J, Iismaa S, Matsuura T, Tsukamoto H, ZEm MA, Graham RM, Kojima S.: Role of Transglutaminase 2 in Liver Injury via Cross-linking and Silencing of Transcription Factor Sp1. *Gastroenterology* 136: 1783-1795 (2009)
15. Saiki R, Park H, Ishii I, Yoshida M, Nishimura K., Toida, T, Tatsukawa H, Kojima S, Ikeguchi Y, Pegg AE, Kashiwagi K, Igarashi K: Brain infarction correlates more closely with acrolein than with reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 404: 1044-1049 (2011)
16. Del Duca, S, Verderio E, Serafini-Fracassini D, Iorio R, Cai G.: The plant extracellular transglutaminase: what mammal analogues tell. *Amino Acids.* 46: 777-792 (2014)
17. Cai G, Sobieszczuk-Nowicka, E., Aloisi, I., Fattorini, L., Serafini-Fracassini, D, Del Duca, S.: Polyamines are common players in different

- facets of plant programmed cell death. *Amino Acids* 47: 27-44 (2015)
18. Cai G, Della Mea M, Faleri C, Fattorini L, Aloisi I, Serafini-Fracassini D, Del Duca S. Spermine either delays or promotes cell death in *Nicotiana tabacum* L. corolla depending on the floral developmental stage and affects the distribution of transglutaminase. *Plant Sci* 241 : 11-22 (2015)
  19. Guilluy C, Rolli-Derkinderen M, Tharoux, PL, Melino G, Pacaud P, Loirand G.: Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 282: 2918-2928 (2007)
  20. Hummerich R, Thumfart JO, Findeisen P, Bartsch D, Schloss P.: Transglutaminase-mediated transamidation of serotonin, dopamine and noradrenaline to fibronectin: evidence for a general mechanism of monoaminylation. *FEBS Lett* 586: 3421-3428 (2012)



# オルニチン脱炭酸酵素活性の測定

植村 武史<sup>1</sup>、大城戸 真喜子<sup>2</sup>

<sup>1</sup>株式会社アミンファーマ研究所、<sup>2</sup>東京慈恵会医科大学

## 【はじめに】

オルニチン脱炭酸酵素 (ODC) は、アミノ酸であるオルニチンからプトレッシンを合成する、ポリアミン生合成の律速酵素である (図1)<sup>1)</sup>。ヒト由来のODCは461アミノ酸からなる分子量約51 kDaの蛋白質であり、2量体を形成することにより活性を発揮する<sup>2)</sup>。また、非常に代謝回転の早い酵素として知られており、その半減期は約11分ほどである<sup>3)</sup>。分解はプロテアソームによってなされるが、ユビキチンに依存しない<sup>4)</sup>。プトレッシンの合成はポリアミン生合成の律速段階の一つであるため、ODC活性は細胞内のポリアミン量と相関する。ガン細胞などでは、ODCの活性が上昇しており、それに伴って細胞内ポリアミン量が増加している<sup>5)</sup>。したがって、ODC活性の測定はポリアミンの生理作用を研究する上で非常に重要なテクニックである。

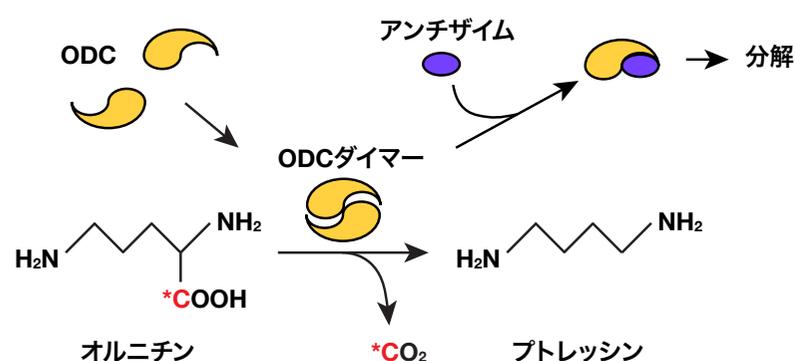


図1 ODCによるプトレッシンの合成

ODCはダイマーで働き、オルニチンを脱炭酸し、プトレッシンを合成する。ODCはアンチザイムによりユビキチン非依存的にプロテアソームで分解される。オルニチンの1位 (図の\*印) を<sup>14</sup>Cで標識しておき、生成したCO<sub>2</sub>のアイソトープ量を測ることにより、ODC活性を測定する。

ODC活性の測定原理はシンプルであり、<sup>14</sup>C標識されたオルニチンを基質として用い、反応産物である二酸化炭素の単位時間当たりの生成量を定量することにより、ODC活性を測定する (図1)。

## <植村>

ここでは、我々の研究室で行っているODC活性測定法を紹介する (図2)。村上らの方法<sup>6)</sup>を改変して用いている。

## 【試薬】

### ODC Assay Buffer

0.5 M EDTA, pH 8.0	2 μL
100 mM DTT (Dithiothreitol)	100 μL
0.1 mg/mL PLP (pyridoxal-5-phosphate)	0.5 mL
0.1 M Na-phosphate, pH 7.2	5 mL
100 mM PMSF	10 μL
Water	/10 mL

### 1 M クエン酸溶液

Citric acid (Fw: 192.1)	19.2 g/100 mL
-------------------------	---------------

### 100 mM DTT

DTT	0.154 g/10 mL
-----	---------------

### 0.1 mg/mL PLP

Pyridoxal-5-phosphate	1 mg/10 mL
-----------------------	------------

### 100 mM PMSF

PMSF	0.0174 g
Isopropanol	/1 mL

10 mM オルニチン

Ornithine HCl (Fw: 168.62)  
0.0169 g/10 mL

Ornithine cocktail

10 mM オルニチン 290  $\mu$ L  
[1-<sup>14</sup>C]ornithine (1.85 GBq/mmol,  
0.1 mCi/mL)<sup>\*1</sup> 145  $\mu$ L  
精製水 145  $\mu$ L

NCS solubilizer

GE Healthcare, NNCS502

【器具】

水浴  
試験管立て  
試験管  
ゴム栓  
ろ紙  
液体シンチレーションカウンター用バイアル  
液体シンチレーションカウンター

【方法】

大腸癌細胞株HCT116を4日間培養した際のODC活性変化を測定した例を紹介する。

細胞抽出液の調整

1. 細胞をPBSで洗浄後、Assay bufferに懸濁する
2. 超音波破碎機で細胞を破壊する
3. 遠心後、上清を新しいチューブに移す
4. 蛋白質定量
5. Assay buffer 200  $\mu$ Lに蛋白質200  $\mu$ gを含むように細胞抽出液を調製しておく

【ODC Assay】

準備

1. 水浴を37°Cにしておく
2. ろ紙を折り、試験管中に引っかかるようにしておく
3. 試験管、ゴム栓を必要数準備し、ラベルをずる
4. 試験管を氷上に置き、十分に冷やしておく
5. オルニチンカクテルを調製し、氷上に置いておく

ODC活性測定

1. 試験管に調製済細胞抽出液200  $\mu$ Lを入れる<sup>\*2</sup>
2. ろ紙を試験管中央に引っ掛ける
3. ろ紙にNCS solubilizerを20  $\mu$ L載せる
4. オルニチンカクテル20  $\mu$ Lを入れ、ゴム栓をし、試験管を振って混ぜる<sup>\*2</sup>
5. すぐに水浴に入れ、30分のカウントを開始する<sup>\*3</sup>

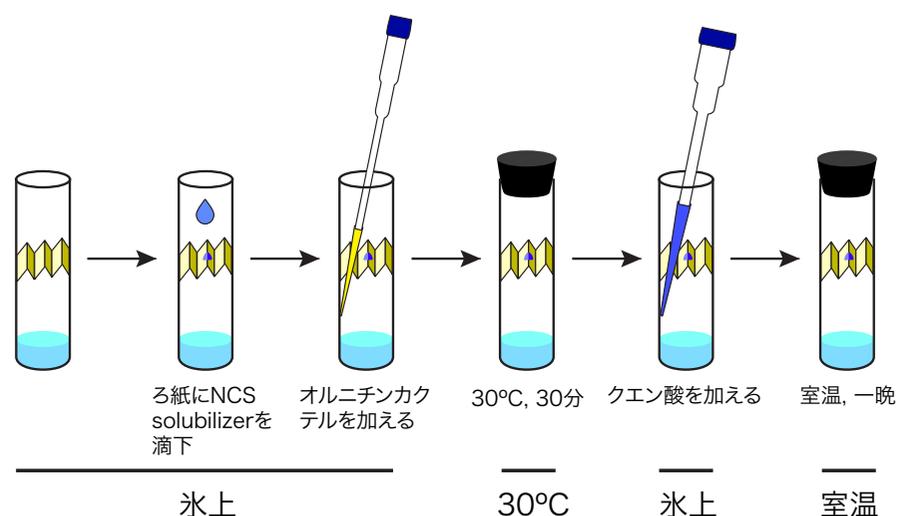


図2 ODC活性測定法

ODC活性測定を模式的に示す。

6. 反応終了後、試験管を氷上に移す
7. クエン酸溶液 (1 M)を500  $\mu$ L加える\*2
8. 試験管を振って混ぜる\*4
9. 室温で一晩静置する
10. 液体シンチレーションカウンター用バイアルにシンチレーターを分注する
11. ろ紙を取り出し、バイアルに入れる
12. ボルテックスミキサーでよく攪拌する
13. 液体シンチレーションカウンターで5分間測定する
14. 計算用に、オルニチンカクテルを1  $\mu$ L取り、カウントを測る
15. バックグラウンド (BG) として、ろ紙だけのカウントを測定する
16. BGを引いたカウントの値を用いて計算する

表1 HCT116細胞のODC活性測定結果

サンプル	CPM-BG	CO <sub>2</sub> (nmol)	ODC活性 (nmol/min/mg protein)
Day 1-1	7654.2	0.96	0.32
Day 2-1	2480.1	0.31	0.10
Day 3-1	1344.5	0.17	0.06
Day 4-1	768.2	0.10	0.03
Day 1-2	7058.1	0.89	0.29
Day 2-2	2586.4	0.33	0.11
Day 3-2	1124.3	0.14	0.05
Day 4-2	523.4	0.07	0.02
Day 1-3	7715.5	0.97	0.32
Day 2-3	2345.6	0.30	0.10
Day 3-3	1214.1	0.15	0.05
Day 4-3	958.6	0.12	0.04
計算用	43714.4	5.5	0.126 pmol/CPM

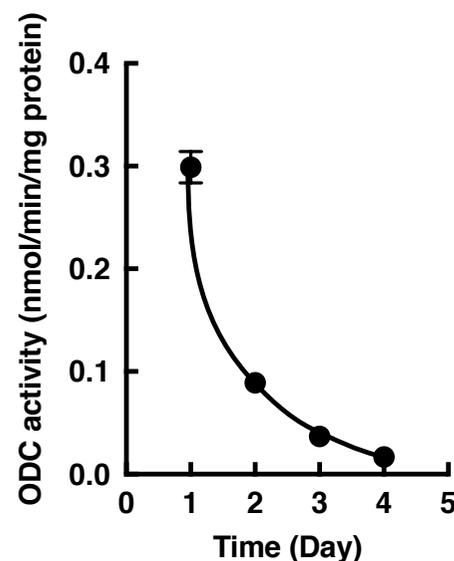


図3 HCT116細胞のODC活性

培養開始後1日置きに細胞を回収し、ODC活性を測定した。3点の平均と標準偏差をプロットしてある。

### 結果

4日間培養した細胞のODC活性測定結果を表1に示す。それぞれ3点ずつ独立した培養を行った。図3に示す通り、培養1日目のODC活性が最も高く、時間依存的に活性が下がることが明らかになった。

### 計算

1. オルニチンカクテル 1  $\mu$ Lに含まれるオルニチンは 5.5 nmolである(標識オルニチンは1.85 GBq/mmol、0.1 mCi/mLなので、オルニチン濃度としては2 mM入っている)。
2. ODCの反応によりオルニチン 1 molからCO<sub>2</sub>が 1 mol生成するので、CPM (count per minute) あたりのCO<sub>2</sub>のmol数を求める。表1のデータでは、計算用CPM-BGが43714.4なので、CPMあたりのCO<sub>2</sub>のmol数は5.5 nmol/43714.4 CPM = 0.126 pmol/CPMとなる。
3. サンプルのCPMから、反応時間あたりのCO<sub>2</sub>生成量を求める。表のDay1-1では、CPM-BGが7654.2であったので、CO<sub>2</sub>生成量は7654.2 CPM×0.126 pmol/CPM = 0.96 nmol。
4. 蛋白質量、反応時間で補正する。今回は蛋白質 100  $\mu$ gを用い、30分間反応させたので、

Day1-1の計算は0.96 nmol/30 min/0.1 mg = 0.32 nmol/min/mg proteinである。

#### ポイント

- \*1 室町機械 製品番号ARC0199。室町機械より、[5-<sup>14</sup>C]ornithineも販売されているが、これではCO<sub>2</sub>に標識がいかないなので、ODC活性測定には用いることはできない。購入時には注意すべきである。
- \*2 試験管の壁に液がなるべくつかないように、チップを底につける。
- \*3 複数サンプルを測定するときは、30秒おき等に順次加えていくと良い。
- \*4 振りすぎて反応液がろ紙につかないよう注意する。また、発生したCO<sub>2</sub>が逃げないように、すぐに蓋をする。

#### <大城戸>

ここでは、慈恵医大 分子生物学講座で用いられているfree ODC活性およびtotal ODC活性の測定法について紹介する<sup>6)</sup>。ODCのLys69とCys360は酵素反応に重要な残基である。ODC反応に必要な求電子触媒をピリドキサル5リン酸 (PLP) が担い、ODCのLys69とシッフ塩基を形成する。またODCのCys360が還元状態であることが安定した活性に必要であることが分かっている<sup>7,8)</sup>。従って反応液の基本組成には、PLPおよび還元剤が含まれる。ODCの触媒によって、1分子オルニチンから1分子のプロレッシンと1分子のCO<sub>2</sub>が生成される。遊離するCO<sub>2</sub>部分が<sup>14</sup>Cによって標識されたオルニチンを基質として用い、発生する<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>をカウントする。

#### 【ODC assay基本組成】

40 mM Tris HCl (pH 7.2)  
 40 μM PLP (pyridoxal-5-phosphate)  
 5 mM DTT (Dithiothreitol) 還元剤  
 0.4 mM オルニチンカクテル  
 (Cold オルニチン + [1-<sup>14</sup>C]オルニチン)  
 調製試料、EDTA等の添加物や水 /125 μL

#### 【試薬】

Reaction mixture 1回の凍結融解となるよう分注し -20°C以下に保存

0.5 M Tris HCl (pH 7.2)  
 0.5 mM PLP (pyridoxal-5-phosphate)  
 62.5 mM DTT

0.3 mM EDTA

TDT buffer (試料調製用buffer)

25 mM Tris HCl (pH 7.2)  
 1 mM DTT (直前に添加)  
 0.01% Tween 80  
 1 mM EDTA

#### [1-<sup>14</sup>C]-L-オルニチン

パーキンエルマー社  
 比放射能 40-60 mCi/mmol  
 規格 1.85 MBq (50 μCi) /0.5 mL  
 (オルニチンカクテルとして800反応分)  
 9.25 MBq (250 μCi) /2.5 mL  
 (オルニチンカクテルとして4000反応分)

1 mM オルニチンカクテル (Cold オルニチン + [1-<sup>14</sup>C]オルニチン)

(以下、250 μCi の1-<sup>14</sup>Cオルニチンを購入した場合、1 mM オルニチンカクテル200 mLの作り方を示す)

比放射能を50 mCi/mmol とすると、250 μCi/2.5 mL中には5 μmol のオルニチンが含まれる。5 μmol分差し引いたColdオルニチン塩酸塩 (33.7-0.84 mg) に、2.5 mL分差し引いた水 (200-2.5 mL) を加え、そこに [1-<sup>14</sup>C]オルニチン 250 μCi (0.84 mg含有) /2.5 mL を添加する。オルニチンカクテルは蒸発しないように4°Cで保管する。活性測定に使用する分を随時取り出す。

6 N HCl 溶存CO<sub>2</sub>を遊離させる

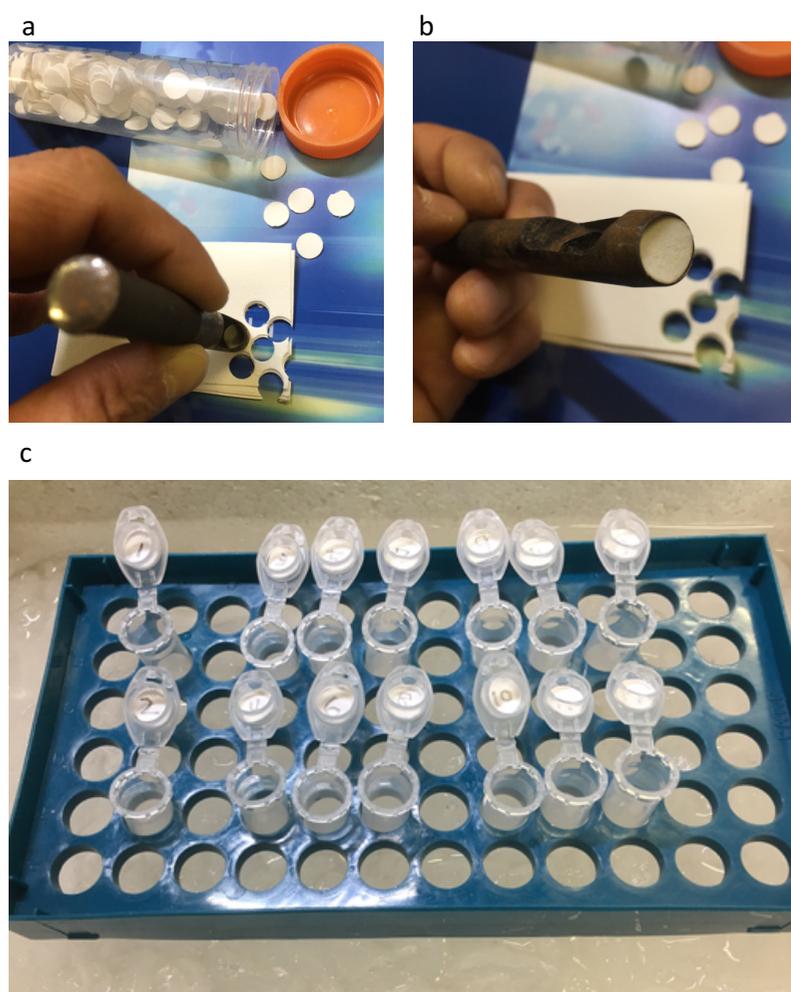


図4 2 mL エッペンドルフチューブを用いたODC 活性測定法

a. 9 mm 革ポンチを用いて9 mm径ろ紙を作製. ろ紙を何重かに折りたたみ皮ポンチと金槌を用いてろ紙をくりぬく。  
b. 革ポンチによってくりぬかれたろ紙. c エッペンドルフホルダーに並べたassay用のチューブ. ホルダーごと氷上や37°C恒温水槽に移動させることによりチューブ間の反応時間の差を最小限にする。

10% KOH 遊離したCO<sub>2</sub>をアルカリ吸着

シンチレーション溶液

ジフェニルオキサザール (DPO もしくはPPO という) 4 gならびに  
フェニルオキサゾリルフェニルオキサゾリルフェニル (POPOP) 0.1 gを  
トルエン:エタノール (7:3) 混液1 L に一晩かけて溶解。遮光保存。

【器具、チューブなど】

37°C 振盪式恒温水槽

水浴可能なエッペンドルフホルダー

2 mL エッペンドルフ (丸底2 mL)

穴あけ用工具 9 mm 革ポンチ

9 mm径ろ紙 (図4a, b)

シンチレーションカウンター用ミニバイアル

β核種測定可能な液体シンチレーションカウンター (LSC-6100 ALOKA)

ドラフト

【試料調製】

培養細胞

1. Dishから培養液を取り除き、PBSで細胞を洗浄する。Dishを氷上に斜め2-3分静置後、残ったPBSを取り除く。この操作を全部で3回繰り返す。
2. Dishごと-20~-80°Cで細胞を凍結後、氷上で融解させる。この操作を全部で3回繰り返す。
3. 氷冷したTDT bufferを用いて、ラバーポリスマンで細胞懸濁液をかき集め、チューブに回収する。
4. Vortex 5秒 3回。必要に応じて最小限の超音波処理を行う。
5. 均質化させた懸濁液の一部はポリアミン測定やタンパク質測定に用いる。
6. 残りの懸濁液を17,000 g, 30-40分冷却遠心する。
7. 遠心上清を別のチューブに移しODC活性、タンパク質測定に用いる。

組織

1. 組織は適当な大きさに細切し、重量の4倍量のTDT buffer を加え、冷却しながらヒスコトロンを用いてホモジェナイズする。
2. 一部は、ポリアミン測定やタンパク質測定に用いる。
3. 残りを17,000 g, 30-40分冷却遠心する。
4. 上清を別のチューブに移しODC活性、タンパク質測定に用いる。

【ODC活性測定】

1. 事前にアイソトープ室の振盪式恒温水槽を37°Cにセットしておく。

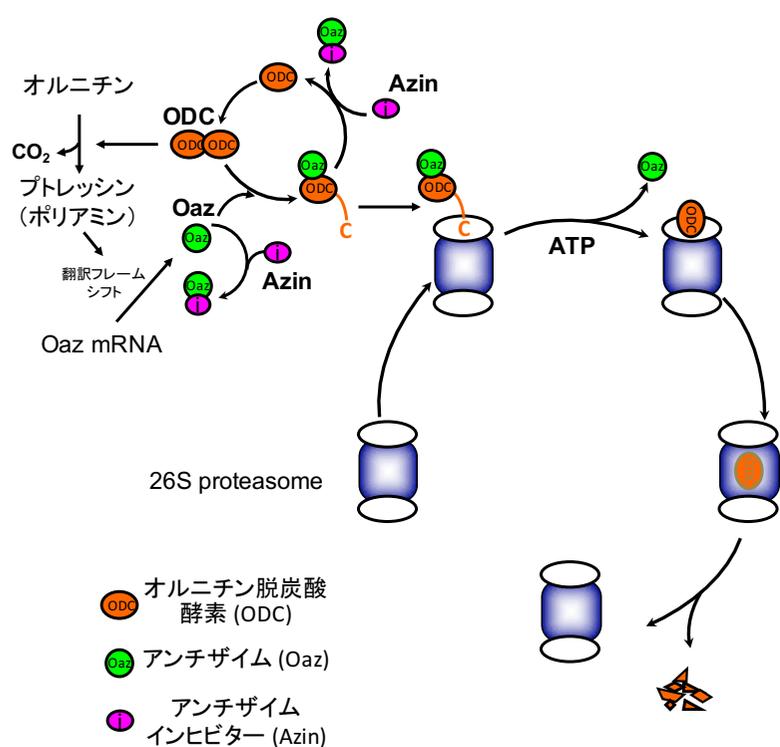


図5 アンチザイムインヒビターによるアンチザイムに結合したODCのアンチザイムから遊離

アンチザイムはODCに結合し活性を阻害し、ユビキチン非依存的にプロテアソームによる分解に導く。アンチザイムに対する親和性がより高いアンチザイムインヒビターの添加は、ODCのアンチザイムからの遊離をもたらす。遊離したODCはODC活性に反映される。

2. 2 mL チューブのフタ裏に、9 mm径ろ紙をはめ込む (黄色チップの裏を使う)
3. ろ紙に鉛筆で番号等を書く。duplicate 測定が望ましい。
4. エッペンドルフホルダーごと2.0 mL エッペンドルフチューブを氷上で冷却しながら、以下を混ぜる (図4c)

Reaction mixture	10 $\mu$ L
0.3 mM EDTA	10 $\mu$ L
抽出試料, もしくは TDT buffer	20 - 40 $\mu$ L
その他添加物、水など	15 - 35 $\mu$ L
total	75 $\mu$ L

5. アイソトープ室に行く。

6. チューブの蓋を開けたまま冷却遠心機でflashし壁についた液を落とす。ただちにチューブを氷上に戻す。
7. オルニチンカクテルを準備する。
8. 2 mLチューブのフタの濾紙に、10% KOH 10  $\mu$ L を載せる。
9. 手際よくオルニチンカクテルを 50  $\mu$ L ずつ加え、速やかにフタをする。
10. エッペンドルフホルダーごと、37°C 恒温水槽に移して、適度に振盪させる。
11. 60分後、エッペンドルフホルダーごと氷上に移して、静かにチューブを冷却させる。十分冷えるのを待つ。
12. 1本ずつ 6 N HCl 50  $\mu$ L を添加する。CO<sub>2</sub>が外に逃げないようにただちにフタをする。
13. 再び 37°C で15分間振盪を続ける。
14. シンチレーションバイアルにシンチレーション液を3.5 mL 加える。少し多めに本数を用意しておく。
15. ろ紙を入れる前に、バイアルの cpm\* を測定し (20秒, 1回)、cpm が低いバイアルのみを使用する (残留する洗剤が cpm を高くさせることがある)。
16. 13.の反応後、ピンセットを用いて、バイアルの中へろ紙を入れる。混和する。10分ほど放置し再度混和する。
17. cpm を測定 (4分 2回)
18. 試料のcpmからBlank (抽出試料無添加) のcpm (バックグラウンド) を差し引く。

\* cpm: count per minute

#### 【計算】

1. 1 mM オルニチンカクテル 5  $\mu$ L (オルニチン 5 nmol) を 9 mm径ろ紙に滴下する。
2. ろ紙をシンチレーションバイアルに入れ、cpmを測定する。
3. 1モルのオルニチンから1モルのCO<sub>2</sub>が生じるので、cpmより1時間あたりに発生する CO<sub>2</sub>のモル数を換算する。

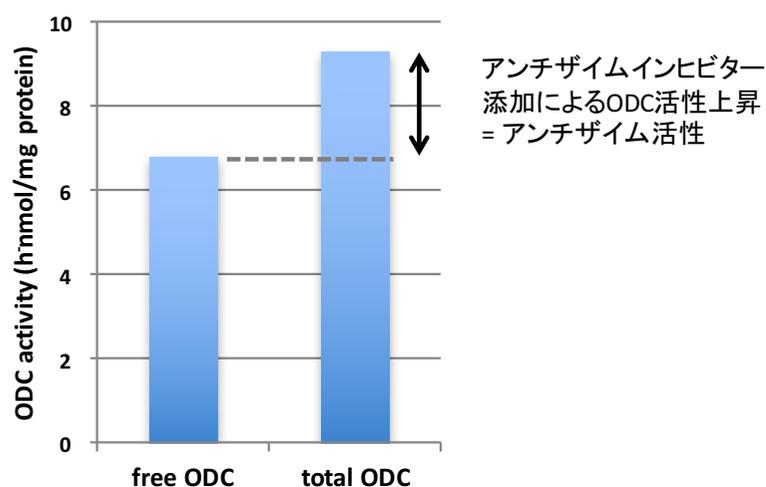


図6 ODC活性測定例 (HEK細胞)

free ODC活性: アンチザイムインヒビター無添加時のODC活性, total ODC活性: アンチザイムインヒビター添加時のODC活性

4. ODC活性としてたんぱく質1 mgあたりの活性を求める。

#### 【free ODC活性 vs total ODC活性】

アンチザイムに結合しているODCは、ODC活性に反映されない。反応液中に十分量のアンチザイムインヒビターを添加する\*\*と、アンチザイムから遊離したODCによる活性の上昇が観察される (図5, 6)。反応液中にアンチザイムインヒビターを添加したときのODC活性をtotal ODC活性、アンチザイムインヒビターを添加しない場合のODC活性をfree ODC活性として、区別して評価している。

\*\* GST-Antizyme inhibitor fusion protein<sup>9)</sup>を大腸菌に発現させ、glutathione-Sepharose 4B beadsで精製し用いている。

#### 【60%コンフルエントHEK293 ODC活性測定例】

1. オルニチンカクテル 5 nmol のカウントは、9219.12 cpmであった。  
→ 1 cpmあたり0.00054 nmolに相当する。
2. 活性に用いた試料 40  $\mu$ L 中のタンパク量は0.042 mgであった。
3. Free ODC 活性

→ 反応1時間当たりのカウント 529.31 cpm<sup>\*\*\*</sup>  
→  $0.00054 \times 529.31 / 0.042$   
=  $6.84 \text{ h}^{-1}\text{nmol/mg protein}$   
=  $0.11 \text{ min}^{-1}\text{nmol/mg protein}$

#### 4. Total ODC 活性

→ 反応1時間当たりのカウント 723.69 cpm<sup>\*\*\*</sup>  
→  $0.00054 \times 723.69 / 0.042 \text{ mg protein}$   
=  $9.35 \text{ h}^{-1}\text{nmol/mg protein}$   
=  $0.16 \text{ min}^{-1}\text{nmol/mg protein}$

\*\*\*バックグラウンドを差し引いた平均

#### 【測定上のポイント】

- ・氷のみより氷水を用いた方が、チューブ内の液はねも少なく、また試料を速やかに冷却できる。
- ・測定したい試料を用いて、直線性のある測定系であるかどうかを事前に確認しておく。

#### 参考文献

1. Pegg, A. E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem J.* 234, 249–262 (1986).
2. Lee, C.-Y., Liu, Y.-L., Lin, C.-L., Liu, G.-Y. & Hung, H.-C. Functional roles of the dimer-interface residues in human ornithine decarboxylase. *PLoS ONE* 9, e104865 (2014).
3. Russell, D. H. & Snyder, S. H. Amine synthesis in regenerating rat liver: extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase. *Mol. Pharmacol.* 5, 253–262 (1969).
4. Pegg, A. E. Regulation of ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 281, 14529–14532 (2006).
5. Gerner, E. W. & Meyskens, F. L. Polyamines and cancer: old molecules, new understanding. *Nat. Rev. Cancer* 4, 781–792 (2004).

6. Murakami, Y., Marumo, M. & Hayashi, S. Ornithine decarboxylase antizyme in kidneys of male and female mice. *Biochem J.* 254, 367-372 (1988).
7. Coleman, C. S., Stanley, B. A. & Pegg, A. E. Effect of mutations at active site residues on the activity of ornithine decarboxylase and its inhibition by active site-directed irreversible inhibitors. *J. Biol. Chem.* 268, 24572-24579 (1993).
8. Coleman, C. S. & Pegg, A. E. Assay of mammalian ornithine decarboxylase activity using [<sup>14</sup>C]ornithine. *Methods Mol. Biol.* 79, 41-44 (1998).
9. Murakami, Y., Ichiba, T., Matsufuji, S. & Hayashi, S. Cloning of antizyme inhibitor, a highly homologous protein to ornithine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 271, 3340-3342 (1996).



## ～質問コーナー～

Q1 何個の細胞数から測定可能ですか？

A1 植村：ODC活性測定とタンパク質定量を合わせて、 $10^6$ 個の細胞があれば十分に測定が可能です。HCT116やHepG2などの接着細胞では、6-wellプレートの1 wellにつき1 サンプルの調製でうまくいっています。

A1 大城戸：コンフルエンスにもよりますが、ODC活性測定とタンパク質定量合わせて6-wellプレートの1 well の細胞数で足りる。1 well に対して、約 100-200  $\mu$ l の試料調製液で調製しています。

Q2 他にODC活性測定方法はありますか？RIを使わない測定方法はないのですか？

A2 ODC活性は、オルニチンからの生成物プロレッシンあるいは、 $\text{CO}_2$ を測定する方法があります。本稿ではRI標識オルニチンを用いて $\text{CO}_2$ を測定する方法を紹介しました。質問に答えるために、まずODC活性測定法としてよく知られているプロレッシンを検出法について紹介します。これはRIを使用する方法です。次にRIを使用しないプロレッシン検出方法を紹介しながらコメントしたいと思います。

## 【よく知られている他のODC活性測定方法】

☆ RI標識オルニチンを用いたプロレッシンの測定

[5- $^{14}\text{C}$ ]オルニチンあるいは[ $^3\text{H}$ ]オルニチンから生成されるプロレッシンを強イオン交換濾紙に選択的に吸着させ放射能を測定する方法<sup>1, 2)</sup>が知られています。プロレッシンからさらに反応が進んでも生成されるスペルミジンやスペルミンも強イオン交換濾紙に吸着されます。

## 【RIを用いない方法の検証①】

☆ RIの代わりに安定同位体標識オルニチンを用いたらODC活性を測れるの？

生成された質量数の異なるプロレッシンを質量分析装置で分析すればよさそうですが、プロレッシンからさらにスペルミジン、スペルミンと反応が進むことも考慮すると解釈が複雑になります。またポリアミンはイオン化しづらいので、イオン化しやすくする工夫や、さらに質量数の異なる内標を用いるなど定量の工夫が必要です<sup>3,4)</sup>。BMB2015ポスターで森谷さんが発表されているので、またポリアミン学会誌上でも取り上げられることを期待しています。

## 【RIを用いない方法の検証②】

☆ 非標識オルニチンを用いたプロレッシンの測定

1. クロマトグラフィを用いたプロレッシン濃度測定<sup>5, 6)</sup>

2. 大豆ジアミンオキシダーゼ (SAO) を用いてプロレッシンから発生する $\text{H}_2\text{O}_2$ の測定<sup>7)</sup>

2の方法によるプロレッシンの検出は、1のHPLCを用いたODC活性測定法<sup>4)</sup>とよく相関し、RI施設を必要としない簡便なODC活性測定法だと報告しています<sup>7)</sup>。これらの方法では、内在性のプロレッシン

ンの存在や生成したプロテインからさらにスペルミジン、スペルミンに反応することへの考慮が必要になると思います。

Q3 ODC活性にunitを使った表現をみかけることがあるのですが、ここで用いられている単位との関係について教えてください。

A3 以下、unitを中心に単位全般について、また本稿で用いた単位との関係について示します。

酵素活性を表す単位としてunitがある。酵素の量ではなく、酵素の生物学的力価を示す単位として使われてきた。1964年に国際生化学連合 (現 国際生化学・分子生物学連合) は、「1 unitは、至適条件下 (温度30°Cで、最も化学反応が進むpH) で毎分1マイクロモルの基質を変化させることができる酵素量 (1マイクロモル毎分)」と定義づけたが、国際単位系 (SI) \*とは無関係のものである。非SI単位である「ユニット」 (unit, 記号U) は、医学や生物化学において酵素活性を表現するために広範に使用されているが、実際のところその定義づけはまちまちである。以下にその例を挙げる。

・制限酵素1 unitの定義 (Takara)

制限酵素活性の1Uは、各酵素反応液50  $\mu$ L中、原則として37°Cで1時間に1  $\mu$ gの $\lambda$  DNAを完全に分解する酵素量とする。

[http://catalog.takarabio.co.jp/product/basic\\_info.php?unitid=U100003737](http://catalog.takarabio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100003737)

・Klenow DNA polymerase 1 unitの定義 (ARB)

標準的な条件下、37°Cで30分間に10 nmolのdNTPを酸不溶物に変換するKlenow DNA Polymeraseを1単位とする。

[http://www.arb-ls.com/products/klenow\\_dna\\_polymerase/](http://www.arb-ls.com/products/klenow_dna_polymerase/)

・中性プロテアーゼの1 unitの定義 (一般財団法人 日本食品分析センター)

カゼインを基質とし、38°C, pH 6.0において、反応初期の1分間に1  $\mu$ gのL-チロシンに相当する非タンパク性のフェノール試薬呈色物質の増加をもたらす活性を1単位とする。

[http://www.jfrl.or.jp/jfrlnews/files/news\\_vol5\\_no3.pdf](http://www.jfrl.or.jp/jfrlnews/files/news_vol5_no3.pdf)

ODC活性1 unitについても、定義づけが異なるケースがみうけられる。

ケース1.

ODC 1 unitは、「37°Cで1マイクロモル毎分 ( $\mu$ mol/min) 産生される $^{14}\text{CO}_2$ の量」と定義する<sup>8)</sup>

ケース2.

ODC 1 unitは、「37°Cで1ナノモル毎時 (nmol/h) 産生される $^{14}\text{CO}_2$ の量」と定義する<sup>9)</sup>

このように、国際生化学連合の採択に準じて表現している場合もあれば、そうでない場合も多々ある。非SI単位である「unit」という表記を見かけたら、その都度定義を確認した方がよい。同じ定義づけと違って単純に比較してしまうと、誤った評価をしかねない。

表1 ODC活性の単位による表記の違い

	ケース1	ケース2	国際単位系 (SI)
単位の定義	unit = $\mu\text{mol}/\text{min}$	unit = $\text{nmol}/\text{h}$	kat = $\text{mol}/\text{s}$
比活性	unit/g protein	unit/mg protein	kat/kg protein
Day1-1	0.32	19.2	$5.33 \times 10^{-6}$
free ODC	0.11	6.8	$1.89 \times 10^{-6}$
total ODC	0.15	9.3	$2.58 \times 10^{-6}$

特に医学や生物化学の分野では、人の健康や安全を脅かす懸念もあり、国際単位系 (SI) の使用を促進することが重要であると、国際単位系 (SI) に関する国際度量衡総会 (CGPM) が見解を示している。1998年10月、酵素活性を表す組立単位としてカタール (単位記号: kat, SI基本単位による表し方:  $\text{mol}/\text{s}$ ) の国際単位系 (SI) への導入が決議された (第21回CGPM 決議12)。特に医学や生物化学の分野における酵素活性の表現のために、SI単位のモル毎秒に対する固有の名称カタール (記号kat) を採用することを決定した<sup>10)</sup>。実測したHCT116とHEK293のODC活性をケース1、ケース2および国際単位系で表現すると表1のようになる。将来、ODC活性もSI単位である $\text{mol}/\text{s}$ やkatで表現されるようになるのかもしれない。

\* 国際単位系 (SI): メートル条約に基づきメートル法のなかで広く使用されてきたMKS系(長さの単位 メートル m, 質量の単位 キログラム kg, 時間の単位 秒 s) を用い、この3つの単位の組み合わせで量の単位を表現したものを拡張したもので、上記の3つの基本単位の他に電流の単位 アンペア A, 熱力学温度の単位 ケルビン K, 物質量の単位 モル mol, 光度の単位 カンデラ cd が加わり、これら7つの基本単位を用い、組立単位によって量を表現したものの<sup>10)</sup>。

(植村・大城戸)

## 参考文献

1. Djuufhuus R: Ornithine decarboxylase (EC 4.1.1.17) assay based upon the retention of putrescine by a strong cation-exchange paper. Anal. Biochem. 113. 352-355, (1981).
2. Amalia T: Determination of ornithine decarboxylase activity using [<sup>3</sup>H]ornithine. Methods Mol. Biol. 79, 33-39 (1998).
3. 中村篤央: GC-MSを用いたポリアミンの分析. ポリアミン学会誌. 2, 54-58 (2015)
4. 森谷俊介: 質量分析計を用いたポリアミンの分析. ポリアミン学会誌. 2, 59-65 (2015)
5. Endo Y: A simple method for the determination of polyamines and histamine and its application to the assay of ornithine and histidine decarboxylase activities. Methods Enzymol. 94, 42-47 (1983)

6. Shenkel E, Berlaimont V, Dubois J, Helson CM, Hanocq M: Improved high-performance liquid chromatographic method for the determination of polyamines as their benzoylated derivatives: application to p388 cancer cells. *J Chromatogr B Biomed Appl.* 668: 189-97 (1995)
7. Badolo L, Berlaimont V, Helson-Cambier M, Hanocq M, Dubois J: Simple and rapid enzymatic assay of ornithine decarboxylase activity. *Talanta.* 48, 127-134 (1999)
8. Caleman CS, Pegg AE: Assay of Mammalian ornithine decarboxylase activity using [<sup>14</sup>C] ornithine. *Polyamine protocols, Methods in Molecular Biology* 79, 41-44, Totowa: Humana Press, (1998).
9. Murakami Y, Marumo M, Hayashi S: Ornithine decarboxylase antizyme in kidneys of male and female mice. *Biochem J.* 254, 367-372 (1988).
10. 国際文書第8版 (2006) 国際単位系 (SI) 日本語版  
<https://www.nmij.jp/library/units/si/R8/SI8J.pdf>



# BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) ワークショップ開催報告

村井 法之  
東京慈恵会医科大学

2015年12月1日(火)、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会)において「生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える」というテーマでワークショップを開催いたしました。オーガナイザーは私と協同乳業株式会社研究所の松本光晴先生が担当しました。オーガナイザーを含め6名の日本のポリアミン研究者に最新の研究を発表していただきました。学会初日の開催ということで参加者数が心配でしたが、始まってみるとその心配は吹き飛んでしまいました。会場は130名くらいの収容数でしたが、なんと立ち見になるほどの参加者でした。顔ぶれを見ても、ポリアミン研究者以外の方が多く参加されていて、議論も活発に行われました。ポリアミンに関心を持たれている研究者が増えたことをとてもうれしく思いました。以下に当日の内容を発表順に簡単にご紹介します。

最初は私がイントロダクションでポリアミンの基本知識と注目されている関連研究分野について、また各演者がどの分野について発表されるのかを紹介しました。続いて私が、細胞内でポリアミン濃度を調節しているタンパク質、アンチザイムのファミリーの1つであるアンチザイム(AZ2)ががん遺伝子産物c-MYCと相互作用しその分解を促進することを示し、細胞内c-MYCの分解にはユビキチン依存的分解以外にユビキチン非依存的分解が存在することを示しました。両分解が細胞内でどのように使い分けられているか、またがん細胞増殖との関連についても興味深い結果です。

東京都医学総合研究所の平松恭子先生は「大腸癌および非小細胞癌の手術前尿中ジアセチルスペルミン値と予後の関連」について発表されました。すでに平松先生らのグループは、ジアセチルスペルミン特異的抗体を用いた大腸癌、乳癌、肺癌などの診断の自動分析試薬を開発されています。本発表では大腸癌や肺癌の術前と術後再発の尿中ジアセチルスペルミンの比較において、測定値の男女差の考慮および再発予測のためのカットオフ値設定により、術前高値群は術後も再発リスクが高いことを示しました。また大腸がんでは、術前のジアセチルスペルミン値とcarcinoembryonic antigen (CEA)値を組み合わせることで、II期およびIII期の患者を早期再発高リスク群と低リスク群に群別できることを示しました。このことから尿中ジアセチルスペルミン値を用いれば、患者にほとんど負担をかけずに、癌の診断だけでなく治療の局面においても臨床的に有用な情報を提供できる可能性が期待されました。

アミンファーマ研究所の植村武史先生は「ポリアミン代謝の抑制はアクロレイン毒性の軽減に関わる」という演題で発表されました。植村先生らのグループは、脳梗塞や自己免疫疾患の細胞障害に、ポリアミン代謝に関連して生成されるアクロレインの毒性が強く関与することを報告し、またアクロレイン値を用いた診断法の開発も行ってきました。本発表では、アクロレイン毒性軽減細胞を単離解析すると、ポリアミン代謝酵素SMOおよびAcPAOの発現が低下していることを示しました。逆にそれらの酵

素を過剰発現させるとアクロレインの毒性が増加したことからポリアミン代謝を抑制することが脳梗塞等の予防、治療に有効である可能性を示しました。

東京大学の松本靖彦先生は「糖尿病合併症に対する生体内ポリアミンの防御作用」という演題で発表されました。松本先生らのグループは、カイコを糖尿病発症機構の解明や治療薬開発のモデル動物として確立しています。糖尿病において血中のグルコースがタンパク質とメイラード反応により生成される糖付加タンパク質が重合すると網膜症、腎症、末梢神経障害などの糖尿病合併症を引き起こすことが知られています。カイコモデルでは糖付加タンパク質の蓄積により成長阻害が起こりますが、その成長阻害を回復させる化合物としてスペルミジンを同定しました。ポリアミン合成阻害剤を投与すると糖付加タンパク質が蓄積し成長阻害が悪化したことから、ポリアミンが糖毒性を軽減する作用を有することを示しました。このことはヒトにおいてもポリアミンが糖尿病合併症の予防や治療に有用である可能性を示唆するもので今後の成果が注目されます。

協同乳業株式会社の松本光晴先生は「腸内細菌が産生するポリアミンの保険効果」という演題で発表されました。ヒトの腸内細菌の研究者である松本先生は、腸内細菌が産生するポリアミンに注目し、ヒトの腸内において腸内細菌にポリアミンを産生させればその炎症抑制、腸管バリア機能の成熟・維持、オートファジー促進などにより疾病の予防・軽減効果が得られることを期待し研究を行っています。腸内細菌として選抜したLK512菌株をマウスに長期投与し、腸内のポリアミン濃度の上昇と長寿命効果を示しました。また腸内細菌を介して腸内のポリアミン産生を亢進するのにアルギニンが有効であることを明らかにしました。さらに記憶や学習への効果解析も進行中であり今後の成果が期待されます。

最後に、自治医科大学の早田邦康先生は「ポリアミンによりもたらされる長寿の生物学的背景」という演題で発表されました。一般的に老化とともに免疫力は低下しますが、逆に炎症反応は起こりやすくなります。早田先生は、培養細胞とマウスを用い、ポリアミンによる遺伝子の異常メチル化の抑制効果を示しました。ポリアミンは特に炎症反応に重要なLymphocyte function-associated antigen1(LFA-1)のプロモーター領域のメチル化を増加させその発現を低下させる効果があるようです。また高ポリアミン食(大豆の3倍程度)を与えたマウスでは加齢に伴うLFA-1増加が抑制され寿命も延びることも示しました。最後にマウスにおける大腸がんの発生頻度は、高ポリアミン食を与えたマウスの方が低いということを示し、ポリアミンは癌で高値となることが知られているけれど、生体内のポリアミンが高値であることが癌の発生を促進するという報告はないことを強調されていました。ポリアミンはどのように異常メチル化を抑制するのか、長寿との関連も含めて今後の詳細な研究が期待されます。

ポリアミン研究者は、40年くらい前に癌でポリアミンが高値となることが報告されてから一時的に増加しましたが、そのころと比べると、現状では世界的にも日本においてもかなり少なくなっています。ポリアミンは「癌で増加する」というイメージが強いため、ポリアミンが体内で増加することは体には悪影響をきたすのではないかと考えがちです。今回のワークショップの発表を含め最近の研究から、ポリアミンは免疫力増強、抗炎症作用、長寿、記憶にも効果があることが明らかとなっており、ポリアミンを摂取することは体にとって良い影響をもたらすという考えが徐々に増えつつあります。我々ポリアミン研究者はその考えを科学的に証明していくことが重要です。同時に患者に負担の少ない癌や脳梗塞の診断法を開発していくことも同様です。

本ワークショップをきっかけにポリアミンに興味をもつ研究者が増え、ポリアミン研究がさらに発展していくことを強く望みます。

## 第7回年会総括

年会世話人 鈴木秀之

京都工芸繊維大学応用生物学系

日本ポリアミン学会第7回年会は、平成27年11月13日（金）・14日（土）の二日間にわたり、京都市左京区の京都工芸繊維大学松ヶ崎キャンパス・60周年記念館において、京都工芸繊維大学との共催により開催された。事前登録者44名、当日参加者12名、京都工芸繊維大学参加者9名、述べ65名の参加により、活発な発表・討論が行われた。

特別講演は、13日夕方、以下のように講演者を招いて1時間行われた。

講演者 Professor Enzo Agostinelli (University of Rome “La Sapienza”)

演題 Cytotoxicity of polyamine metabolites induces apoptosis on tumor cells:

New approaches in cancer therapy by nanocarriers through proteomic studies

一般講演（15分）は、13日に11演題、14日に11演題、計22演題が発表された。「微生物とポリアミン」、「ポリアミンとRNA」、「ポリアミンと健康」、「ポリアミンと疾患」および「ポリアミンと植物」のセッションに分けて発表を行い、活発な討論が行われた。企業からの参加者も多く、食品・健康の面からポリアミンが注目されるようになってきていることがうかがえた。

懇親会は、13日の晩に60周年記念館2階大セミナー室で開催され、52名が参加し、有意義な意見交換を行うことができた。

なお、本年会に対して、東洋紡株式会社様から年会抄録集への広告掲載によるご支援を賜り、また、協同乳業株式会社様からは乳製品のご提供賜り、年會を盛大にすることができた。ここに記して感謝の意を表す。



## 日本ポリアミン学会第7回評議員会議事録

日時: 平成27年11月14日 (土) 11:45~13:00

会場: 京都工芸繊維大学60周年記念館2階小セミナー室

出席者: 五十嵐一衛、大島泰郎、大澤仲昭、岡 孝己、塩川光一郎、柏木敬子、河合剛太、川喜田正夫、草野友延、早田邦康、松藤千弥、鈴木秀之、村井法之

議事予定:

### 1. 役員人事

#### 1) 会長の交代

大島泰郎氏より会長職を辞職したいとの申出があった。

新会長に五十嵐一衛氏 (アミンファーマ研究所) が推薦された。

#### 2) 第10回年会担当役員の選出

栗原 新氏 (石川県立大学) を第10回年会担当役員に推薦された。

### 2. 学会印・学会会長印作製の報告及び管理・使用規則について

学会印および学会会長印を作製した。これらの公印管理使用規則を作成した (日本ポリアミン学会 公印管理使用規則)。

### 3. 事業報告

#### 1) 会員数・会費納入状況

#### 2) 学会誌の発行 ポリアミン 第2巻1号(2015年 4月) 2号(2015年10月)

### 4. 事業計画

1) 第8回年会(千葉)年会担当役員: 河合剛太氏、根本直樹氏 (千葉工業大学) 開催場所検討  
開催場所として①かずさアカデミアパーク②千葉工業大学津田沼キャンパスの2ヶ所が候補となった。

2) 第9回年会 (兵庫) 年会担当役員 : 藤原伸介氏 (関西学院大学)

3) トランスグルタミナーゼ・ポリアミン合同学術集会 (平成28年度9月開催の第89回日本生化学会大会 (仙台) の前後または期間中に開催予定)

#### 4) 広報活動について

・学会誌の発行 (2回/年)

### 5. 会計報告

1) 事務局より平成26年度決算および監査が報告され承認された。

2) 事務局より平成27年度収支状況について報告があった。

3) 事務局より平成28年度予算の報告があり承認された。

### 6. 連絡事項

事務局より今後開催予定の国内および国際学会について連絡があった。

#### 1) 開催予定の国際会議

The 4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and

### Clinical Perspectives

会期：2016年9月4日(日)～9日(金)

会場：Rome (Tivoli) ITALY

オーガナイザー: Enzo Agostinelli and Kazuei Igarashi

2) BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) ワークショップ開催

【1W8-p】生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える

オーガナイザー：村井法之（東京慈恵会医科大学）/松本 光晴（協同乳業株式会社研究所）

日時：2015年12月1日（火） 14:00 - 16:30

会場：神戸ポートピアホテル 本館地下1階 北野（第8会場）

### 7. その他

1) 第7回総会議長・副議長候補推薦

第7回総会議長候補に根本直樹氏（千葉工業大学）、副議長候補に渡邊卓巳氏（コンビ株式会社）を推薦することとした。

以上



## 日本ポリアミン学会第7回総会議事録

日時: 平成27年11月14日(土) 11:45~13:00

会場: 京都工芸繊維大学60周年記念館1階講義室

議事:

### 1. 議長および副議長の選出

議長: 根本直樹氏(千葉工業大学)を選出した。

副議長: 渡邊卓巳氏(コンビ株式会社)を選出した。

### 2.

#### 1. 役員人事

##### 1) 会長の交代

大島泰郎氏が自己都合により会長職を辞職した。

評議員会より推薦された五十嵐一衛氏(アミンファーマ研究所)が新会長に承認された。

##### 2) 第10回年会担当役員の選出

評議員会より推薦された栗原 新氏(石川県立大学)を第10回年会担当役員に承認された。

#### 2. 学会印・学会会長印作製の報告及び管理・使用規則について

学会印および学会会長印を作製およびこれら公印管理使用規則(日本ポリアミン学会 公印管理使用規則)が承認された。

#### 3. 事業報告

##### 1) 会員数・会費納入状況

##### 2) 学会誌の発行 ポリアミン 第2巻1号(2015年4月) 2号(2015年10月)

#### 4. 事業計画

1) 第8回年会(千葉)年会担当役員: 河合剛太氏、根本直樹氏(千葉工業大学)開催場所  
千葉工業大学津田沼キャンパスを開催場所として決定した。

2) 第9回年会(兵庫) 年会担当役員: 藤原伸介氏(関西学院大学)

3) トランスグルタミナーゼ・ポリアミン合同学術集会(平成28年度9月開催の第89回日本生化学会大会(仙台)の前後または期間中に開催予定)

##### 4) 広報活動について

・学会誌の発行(2回/年)

#### 5. 会計報告

1) 事務局より平成26年度決算および監査が報告され承認された。

2) 事務局より平成27年度収支状況について報告があった。

3) 事務局より平成28年度予算の報告があり承認された。

### 6. 連絡事項

事務局より今後開催予定の国内および国際学会について連絡があった。

#### 1) 開催予定の国際会議

The 4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives

会期：2016年9月4日(日)～9日(金)

会場：Rome (Tivoli) ITALY

オーガナイザー: Enzo Agostinelli and Kazuei Igarashi

#### 2) BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 合同大会) ワークショップ開催

【1W8-p】生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える

オーガナイザー：村井法之 (東京慈恵会医科大学) / 松本 光晴 (協同乳業株式会社研究所)

日時：2015年12月1日 (火) 14:00 - 16:30

会場：神戸ポートピアホテル 本館地下1階 北野 (第8会場)



### 学会より

#### ○学会費の納入をお願いします

今年度の学会費の納入をお願いいたします。会計年度は4月からとなっております。研究室でまとめて納入される場合は、事務局 ([polyamine@jikei.ac.jp](mailto:polyamine@jikei.ac.jp)、TEL:03-3433-1111(内)2275、FAX:03-3436-3897) まで納入者全員のお名前をお知らせください。これまでの未納分のある方は合わせてご納入ください。よろしくをお願いいたします。

1.会費 (年額) 正会員 一般 4,000円 学生 2,000  
賛助会員 30,000円

2.振込先 三菱東京UFJ銀行 虎ノ門支店 (支店番号:041)  
普通口座 0084363 日本ポリアミン学会 事務局 松藤千弥

#### ○退会の届出をお願いします

卒業等でポリアミン学会を退会される方は事務局までお知らせください。既卒の方については研究室の代表の方がまとめてご報告くださると助かります。

#### ○4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical perspectivesのお知らせ

上記国際会議が2016年9月4日から9日までItalyのTivoliで開催されます。詳細は会議HPでご確認ください。

<http://www.polyamines2016.com/>

#### ○日本ポリアミン学会 第8回年会のお知らせ

会期:平成29年1月20日(金)、21日(土)

会場:千葉工業大学 津田沼キャンパス 2号館3階大教室(予定)

交通アクセス

<http://www.it-chiba.ac.jp/institute/access/>

キャンパスマップ <http://www.it-chiba.ac.jp/campusmap/tsudanuma/index.html>

年会担当:河合剛太、根本直樹(千葉工業大学)

e-mail: [polyamine@it-chiba.ac.jp](mailto:polyamine@it-chiba.ac.jp)



学会収支一覧（平成 27 年 11 月）

	平成27年度予算	平成27年度収支 (平成27年11月2日現在)	平成28年度予算
収入の部			
学会費(正会員)	370,000	234,000	370,000
	(一般×80・学生×25)	(一般×56・学生×5)	(一般×80・学生×25)
学会費(賛助会員)	30,000	30,000	30,000
	(1社)	(1社)	(1社)
その他			
前年度繰越金	1,600,000	1,674,212	1,600,000
利息		118	
合計	2,000,000	1,938,330	2,000,000
支出の部			
会議費	50,000	0	50,000
事務費	10,000	27,542	10,000
年会・国際学会等補助	150,000	100,000	150,000
若手学会参加補助	420,000	280,000	0
その他			
広報委員会	30,000	0	30,000
次年度繰越金	1,340,000	1,530,788	1,760,000
合計	2,000,000	1,938,330	2,000,000

■ H27 年度支出 事務費 27,540 円（内訳 学会印および学会会長印 24,680 円，振込手数料 2,122 円，通信費 740 円）

■ H27 年度支出 若手学会参加補助 70,000 円×4 名

■ H28 年度予算 H27 年度開催予定であったトランスグルタミンナーゼ研究会との学術集会が H28 年度に延期



### 「最新の研究紹介」という企画を立ち上げます！！

本企画は、本学会員にポリアミン関連の最新の研究についての有用な情報を提供するために設けました。下記の二つのパートで構成されます。

- ①ポリアミン関連の論文を公表した著者がその研究内容を紹介する。
- ②ポリアミン関連の注目の論文を見つけた人がその研究内容を紹介する。

①について、皆様が発表した最新の研究を解説した原稿を募集いたします。本学会誌を研究のアピールの場としても利用していただきたいと思います。

②について、「この研究論文は面白いから是非とも紹介したい！！」「この研究論文は重要だから広く学会員に知ってもらいたい！！」と思われた方は、原稿を作成する前に事務局に投稿希望の旨を連絡して下さい。同じ論文に複数投稿希望があった場合、投稿者合意の上、全て掲載する予定でいます。ただし、同一グループからの重複投稿は事務局で調整いたします。

[原稿の形式]

A5 (A4の半分のサイズ) に収まるように作成して下さい。下記に例を示します。三つの部分で構成されています。下記の例文は35文字×20行で記載しています。

1. 日本語の論文のタイトル、本解説文を作成した著者名と所属
2. 論文のタイトル、著者名、雑誌名、発表年、号、ページ
3. 研究内容の要約

学会員参加型の企画ですので、皆様の積極的なご投稿お待ちしております！！

#### II型糖尿病治療薬の治療効果を評価するための糖尿病カイコモデル

松本靖彦、関水久

東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学

**Diabetic silkworms for evaluation of therapeutically effective drugs against type II diabetes.**  
Yasuhiko Matsumoto, Masaki Ishii, Yohei Hayashi, Shinya Miyazaki, Takuya Sugita, Eriko Sumiya, and Kazuhisa Sekimizu  
*Scientific Reports*, 2015, 5: 10722

代表的な糖尿病治療薬であるインスリンが効果を示さないII型糖尿病患者数は世界的に増加傾向にあり、創薬のための新たな手法の開発は重要である。本研究で我々は、II型糖尿病に対して治療有効性を示す候補化合物を評価するための糖尿病カイコモデルを確立したので報告する。高グルコース餌を長時間(18時間)食べさせたカイコでは、体液中の糖濃度の上昇、脂質の蓄積、インスリン抵抗性、空腹時血糖の上昇、耐糖能の低下など、II型糖尿病患者と似た症状を示すことが明らかとなった。さらに、II型糖尿病治療薬であるピオグリタゾン、メトホルミンの投与により、糖尿病カイコにおける空腹時血糖の上昇や耐糖能の低下などの症状の改善がみられた。我々は、本研究で確立されたカイコの糖尿病モデルがII型糖尿病治療薬の開発に貢献することを期待している。

花のつぼみもほころぶ春、四月から新しい生活のスタートを期待している研究室も多いのではないのでしょうか。

2014年に発足しました日本ポリアミン学会は、今年から二代目会長に五十嵐一衛先生が就任されました。会長のご挨拶を今号の巻頭言として執筆していただきました。その中で、「“ポリアミン”の研究が面白い事を皆さんに広く知って頂き、世界的にもポリアミン研究が減少しているのに歯止めをいかにかけるか、それは研究室を主宰されている先生方が、ポリアミンが面白い研究対象であることを情熱を持って若い人にいかに伝えられるかだ。」とご提案されていますが、これはまさに若い人のポリアミン研究ひいては学会存続として今後の大きな課題となってくるかと思えます。この学会誌が、他の研究分野の先生方や、学生達にポリアミン研究をわかりやすく紹介し、若手研究者の活性化を目指す手助けになれば幸いです。

今号は、ポリアミンによる直接の生理作用とは違いますが、種々の蛋白質の生理機能の中で、ポリアミンが重要なポジションを担っているという2つの蛋白質について、西村先生にeIF5Aについて、人見先生にトランスグルタミナーゼについて執筆していただきました。このような研究から波及し、他の分野の研究者の方々にポリアミン研究を広げるきっかけになればと願っております。シリーズ実験ノートでは、一つの研究室から誕生した測定法が、いろいろな研究室や時代を経ることによって、それぞれ独自に発展し、より良い測定法となっていることを植村、大城戸両先生方から包み隠さず紹介していただきました。このような面白い対戦のような企画ができることも「自由な精神の場」であるべきというポリアミン学会ならではの事だと思っております。皆様のご意見、ご要望をお待ちしております。

(広報委員会 委員 照井祐介)

**日本ポリアミン学会 学会誌「ポリアミン」  
第3巻1号(2016年4月)**

発行:日本ポリアミン学会

<http://pa.umin.jp/>

[polyamine@jikei.ac.jp](mailto:polyamine@jikei.ac.jp)

製作:日本ポリアミン学会 広報委員会